



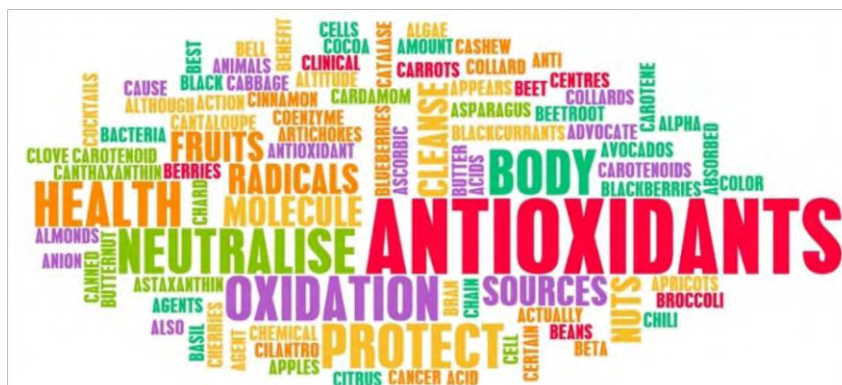
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Τοξικολογία»

Έκφραση και ενζυμική δραστικότητα των ενζύμων, S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, υπεροξειδικής δισμουτάσης και συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης σε ιστούς (ήπαρ και σπλήνα) προβάτων, μετά από τη χορήγηση τροφής εμπλουτισμένης με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου.



Expression and enzymatic activity of enzymes, S-glutathione transferase, superoxide dismutase and gamma- glutamylcysteine synthetase in tissues (liver and spleen) from sheep that consumed feed enriched with oil mill waste water.

Κομίνη Ουρανία

Λάρισα, 2017

Έκφραση και ενζυμική δραστικότητα των ενζύμων, S- τρανσφεράση της γλουταθειόνης, υπεροξειδικής δισμουτάσης και συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης σε ιστούς (ήπαρ και σπλήνα) προβάτων, μετά από τη χορήγηση τροφής εμπλουτισμένης με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου.

### Τριμελής επιτροπή

**Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Δημήτριος Στάγκος:** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Αριστείδης Τσατσάκης:** Καθηγητής Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Κουρέτα Δημήτριο του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η πόρτα του γραφείου του ήταν πάντα ανοιχτή τόσο για επιστημονικές συζητήσεις πάνω στην διπλωματική μου εργασία όσο και για συζητήσεις γενικότερου ενδιαφέροντος.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον επίκουρο καθηγητή, κύριο Στάγκο Δημήτριο του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κύριο Αριστείδη Τσατσάκη, καθηγητή Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Είμαι ευγνώμων για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους σε αυτή τη διατριβή.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου «Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών» του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την συνεργασία και το ιδιαίτερα φιλικό περιβάλλον, αλλά ιδιαίτερα την Δρ. Κερασιώτη Ευθαλία που συνέβαλε στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην οικογένειά μου. Οι λέξεις δεν μπορούν να εκφράσουν πόσο ευγνώμων είμαι στους γονείς μου Χριστόφορο και Φωτεινή για όλες τις θυσίες που έχουν κάνει για λογαριασμό μου, και στον αδερφό μου Νίκο για την αμέριστη υποστήριξή του όλα αυτά τα χρόνια. Στο τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύντροφό μου Κώστα που ήταν παρών σε όλες τις δύσκολες στιγμές και πάντα με βοηθούσε να συνεχίζω να προσπαθώ και να γίνομαι τόσο καλύτερος άνθρωπος όσο και καλύτερος επιστήμονας. Αυτό το επίτευγμα δεν θα ήταν δυνατό χωρίς τον καθένα τους ξεχωριστά.

Σας ευχαριστώ

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	5
Abstract .....	6
1. Εισαγωγή .....	7
1.1. Ελιά.....	7
1.2. Η συγκομιδή της ελιάς.....	8
1.3. Πολυφαινόλες.....	9
1.3.1. Φυτικές πολυφαινόλες .....	9
1.3.2. Προστατευτικός ρόλος πολυφαινολών από ΥΑΕ .....	12
1.4. Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου .....	14
1.5. Ελεύθερες ρίζες .....	15
1.6. Βιολογική δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου .....	17
1.6.1. Θετικές επιδράσεις.....	17
1.6.2. Αρνητικές επιδράσεις .....	17
1.7. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί .....	17
1.7.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί .....	18
1.7.1.1. Υπεροξειδική δισμουτάση .....	18
1.7.1.2. Καταλάση.....	18
1.7.1.3. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.....	19
1.7.1.4. Αναγωγή της γλουταθειόνης.....	19
1.7.2.1. Γλουταθειόνη.....	20
1.7.2.2. Βιταμίνη Α.....	21
1.7.2.3. Βιταμίνη C.....	21
1.7.2.4. Βιταμίνη Ε.....	22
1.7.2.5. Ουρικό οξύ.....	22
1.7.2.6. Συνένζυμο Q10 .....	22
1.8. Οξειδωτικό στρες.....	23
2. Σκοπός .....	25
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	26
3.1. Παραγωγή σιτηρεσίου.....	27
3.1.1. Εισαγωγή .....	27
3.1.2. Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος .....	30
3.1.3. Παρασκευή πολυφαινολικού σιτηρεσίου.....	31
3.2. Ομογενοποίηση ιστών.....	33

3.3.	Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	33
3.4.	Προσδιορισμός της δραστικότητας της Τρανσφεράσης της Γλουταθειόνης (GST) .....	34
3.5.	Προσδιορισμός της δραστικότητας της Υπεροξειδικής Δισμουτάσης (SOD).....	35
3.6.	Προσδιορισμός των επιπέδων της Συνθετάσης της Γλουταθειόνης με την μέθοδο Western Blot.....	35
4.	Αποτελέσματα .....	40
5.	Συζήτηση.....	49
6.	Βιβλιογραφία .....	53

## Περίληψη

Για την παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε εκτροφή στο στάδιο του απογαλακτισμού είκοσι οκτώ προβάτων της ελληνικής φυλής «Χιώτικα», με πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου και στην συνέχεια ακολούθησε η μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης στο ήπαρ και στον σπλήνα.

Τα είκοσι οκτώ πρόβατα χωρίστηκαν σε δυο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από τα νεαρά πρόβατα στο σιτηρέσιο των οποίων η ζωοτροφή ήταν πλούσια σε πολυφαινόλες από ΥΑΕ. Το πειραματικό πλάνο διήρκησε 70 ημέρες εκ των οποίων στις πρώτες 15 τα ζώα τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Ιστοληψία πραγματοποιήθηκε στις 42 και 70 ημέρες. Πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένη ηλικία των ζώων με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στην ευζωία και τέλος, την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στο τελικό βάρος. Στην συνέχεια, ελέγχθηκαν οι δείκτες της αντιοξειδωτικής κατάστασης, όπως η Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η Συνθάση της γλουταθειόνης (GCS).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε μια αύξηση των επιπέδων της GST τόσο στο ήπαρ (17,8%) όσο και στον σπλήνα στις 42 ημέρες (37,7%). Δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή των επιπέδων της υπεροξειδικής δισμουτάσης ενώ υπήρχε μείωση των επιπέδων της GCS στο ήπαρ (-20%) και στον σπλήνα (-37,5%) στις 42 ημέρες.

Σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου<sup>1-3</sup> τα αποτελέσματα αυτά ενίσχυσαν την θεωρία ότι τα πολυφαινολικά πρόσθετα των ΥΑΕ είχαν ευεργετική δράση στο ήπαρ και στον σπλήνα και στην συνολική αντιοξειδωτική άμυνα των προβάτων. Τέλος, επιβεβαιώθηκε ότι η χρήση των ΥΑΕ στην παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων μπορεί να επιλύσει ταυτόχρονα και τα οικολογικά προβλήματα που δημιουργούνται από την εναπόθεσή τους στο περιβάλλον.

## Abstract

For the purposes of this thesis twenty-eight sheep of Greek race “Chios” bred until the stage of ablactation with polyphenolic additives from processed oil mill wastewaters (OMWW) and followed by the study of the antioxidant activity in the liver and spleen.

The twenty-eight sheep were divided into two groups. The first group was the control group and the second group was the group of sheep whose diet was rich in polyphenols derived from OMWW. The experimental plan lasted 70 days, of which the first 15 days the animals were fed only with breast milk. Tissues from the animals were collected on 42 and 70 days. These samples were obtained in certain time points to assess the impact of functional feed on welfare, and finally the assessment of the impact of functional feed on the final animal weight. Afterwards, indicators of antioxidant status were tested, such as glutathione transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) and glutathione synthase (GCS).

According to the results, a rise of GST levels has been observed in both tissues, liver (17.8%) and spleen at 42 days (37.7%). No change in the levels of superoxide dismutase was observed and there was a reduction in GCS levels in liver (-20%) and spleen (-37.5%) in 42 days.

Consistent with previous studies from our laboratory these results reinforced the theory that polyphenolic additives derived from OMWW had a beneficial effect in the liver and spleen and total antioxidant defense of the sheep. Finally, it was confirmed that the use of OMWW in the production of functional food can solve simultaneously the ecological problems caused by the deposition of OMWW in the environment.

## 1. Εισαγωγή

### 1.1.Ελιά

Η ελιά (*Olea europaea*) είναι ένα αειθαλές δέντρο της οικογένειας των Ελαιοειδών (*Oleaceae*) που ευδοκίμει στη Μεσόγειο, την Ασία και την Αφρική. Δεν υπερβαίνει τα 8- 15 μέτρα σε ύψος. Ο καρπός του ονομάζεται επίσης ελιά και από αυτόν παράγεται το ελαιόλαδο. Έχει φύλλα αντίθετα, λογχοειδή, δερματώδη, σκουροπράσινα στην άνω



Εικόνα 1 Η ελιά

επιφάνεια και αργυρόχροα στην κάτω. Τα άνθη της είναι λευκωπά, μονοπέταλα και πολύ μικρά, σχηματίζουν ταξιανθία βότρυος και εμφανίζονται προς το τέλος Μαΐου, ενώ ο καρπός ωριμάζει και συλλέγεται κατά τα τέλη του φθινοπώρου και αρχές του χειμώνα. Ο κορμός της ελιάς είναι οζώδης και καλύπτεται από τεφρόφαιο φλοιό.

Η ελιά υπήρξε το σύμβολο της θεάς Αθηνάς. Είναι γνωστή από τους αρχαιότετους χρόνους, και πιθανότατα κατάγεται από το χώρο της ανατολικής Μεσογείου. Σύμφωνα με την αρχαία ελληνική παράδοση, πατρίδα της ελιάς είναι η Αθήνα και η πρώτη ελιά φυτεύτηκε από την Αθηνά στην Ακρόπολη. Οι Έλληνες ήταν ο πρώτος λαός που καλλιέργησε την ελιά στον ευρωπαϊκό μεσογειακό χώρο. Την μετέφεραν είτε Έλληνες άποικοι είτε Φοίνικες έμποροι.

Η ελιά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην διατροφή, όσο και στην ιατρική. Ο καρπός της είναι πολύ βασικός για την Μεσογειακή διατροφή τόσο ως εδώδιμος όσο και ως ελαιόλαδο. Από το 4000 π.Χ. ήταν γνωστή η χρήση του ελαιόλαδου για θεραπευτικούς σκοπούς. Ήδη από την ιστορία πολλοί αναγνώρισαν την αξία του. Ο Αριστοτέλης μελέτησε την ελιά και ο Σόλων νομοθέτησε την προστασία της. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο Όμηρος που παρομοίασε με χρυσό υγρό. Ο Ιπποκράτης στις εργασίες του αναφέρει πάνω από 60 φαρμακευτικές και ιατρικές χρήσεις του ελαιόλαδου. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν το εκχύλισμα από τα φύλλα της ελιάς για την διατήρηση του σώματος των νεκρών, αφού παρεμπόδιζε την ανάπτυξη μικροοργανισμών που καταστρέφουν τις σάρκες.



Τέλος, ως έπαθλο των Ολυμπιονικών δίδονταν ο κότινος, το στεφάνι από κλαδί της ιερής αγριελιάς που είχε βλαστήσει έξω από τον οπισθόδομο του ναού του Δία στην Ολυμπία. Στα Παναθήναια σημαντικό ρόλο έπαιζε η ελιά του Ερεχθείου, αλλά και τα στέφανα που φτιάχνονταν με τα κλαδιά της. Στην ιερή πομπή στους δρόμους της Αθήνας συμμετείχαν οι θαλλοφόροι, γέροντες ωραίοι και ευθυτενείς, που κρατούσαν στα χέρια τους κλάδους ελαίας.



Εικόνα 2 Η Νίκη στεφανώνει αθλητή με κλαδί ελιάς. Λεπτομέρεια από βάζο 5 αιώνας π.Χ.

## 1.2. Η συγκομιδή της ελιάς

Ο καρπός της ελιάς ωριμάζει στα μέσα προς τέλος του φθινοπώρου, οπότε και ξεκινάει η συγκομιδή. Η ελιά παραδοσιακά μαζεύεται με το χέρι, και το μάζεμα της αποτελεί εδώ και αιώνες σημαντική αγροτική δραστηριότητα σε πολλές περιοχές της Μεσογείου.

Τα κλαδιά περνιούνται με το "χτένι" για να αποσπαστεί ο καρπός με μεγαλύτερη ευκολία και ταχύτητα, ενώ το έδαφος κάτω από την ελιά στρώνεται με ελαιόπανα ή με ειδικό δίχτυ από συνθετικό υλικό. Σκάλες από ξύλο ή αλουμίνιο χρησιμοποιούνται για το μάζεμα των δυσπρόσιτων κλαδιών. Αφού πέσουν οι ελιές από το δέντρο, οι αγρότες τινάζουν τα άκρα των ελαιόπανων ώστε να



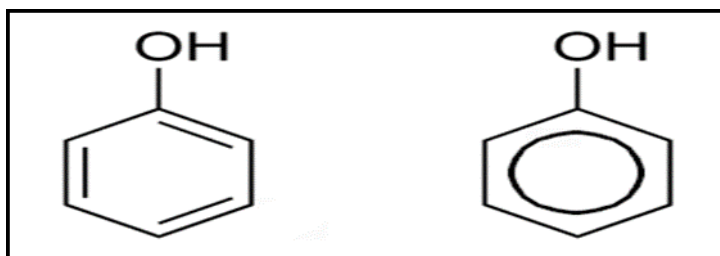
Εικόνα 3 Η συγκομιδή της ελιάς

δημιουργηθούν σωροί, οι οποίοι θα καθαριστούν με το χέρι από χοντρά κλαριά και τσαμπιά προκειμένου να τοποθετηθούν στη συνέχεια σε δοχεία μεταφοράς και σακιά και να μεταφερθούν στον χώρο αποθήκευσης. Η απομάκρυνση των φύλλων δεν είναι απαραίτητη, καθώς στο ελαιοτριβείο υπάρχει ειδικό μηχάνημα που τα απομακρύνει με αέρα. Εναλλακτικά, η ελιά τινάζεται με ξύλινα ραβδιά. Η τεχνική όμως αυτή μπορεί να εφαρμοστεί μόνο όταν έχει ωριμάσει πλήρως ο καρπός και είναι εύκολη η απόσπασή του από το δέντρο. Σε μεγάλους ελαιώνες χρησιμοποιούνται συχνά ειδικά μηχανήματα για τη συγκομιδή. Τέλος, είναι σύνηθες

κατά τη συγκομιδή να κόβονται με πριόνι επιλεγμένα κλαδιά του δέντρου, τόσο για τη διευκόλυνση της συγκομιδής, όσο και για να βοηθηθεί η σωστή ανάπτυξη του δέντρου.

### 1.3. Πολυφαινόλες

Είναι μία τάξη φυσικών, συνθετικών και ημισυνθετικών οργανικών χημικών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών φαινολικών δομών. Ο όρος πολυφαινόλη, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1894. Είναι δηλαδή, μόρια όπου έχουν μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες, σε δεσμό με το άτομο του άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι  $C_6H_5OH$ , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 4 Φαινολικό οξύ. Η απλούστερη φαινόλη

Είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους. Συναντώνται σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, από τις αλκοόλες ιδίου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου που έχουν.

#### 1.3.1. Φυτικές πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά<sup>4</sup>. Βρίσκονται στα φυτά και στα τρόφιμα, τα προστατεύουν από εξωτερικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και οι μικροβιακές εισβολές, ενισχύοντας τη φυσική τους άμυνα. Στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες μπορούν να συμβάλλουν στην πικρή γεύση, στυφότητα, στο χρώμα, στη γεύση, στην οσμή και στην οξειδωτική σταθερότητα. Η κύρια πηγή για τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά είναι η διατροφή, μιας και οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε ποικιλίες τροφίμων που περιέχουν φυτοθρεπτικά

συστατικά. Τα περισσότερα όσπρια, φρούτα (όπως μήλα, μούρα, πεπόνι, κεράσια, σταφύλια, αχλάδια, δαμάσκηνα, βατόμουρα, και φράουλες), και λαχανικά (όπως μπρόκολο, λάχανο, σέλινο, κρεμμύδι και μαϊντανός) είναι πλούσια σε πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά. Το κόκκινο κρασί, η σοκολάτα, το πράσινο τσάι, το ελαιόλαδο, η γύρη της μέλισσας είναι εναλλακτικές πηγές. Χιλιάδες είναι τα αντιοξειδωτικά και καθένα από αυτά έχει διαφορετικές ιδιότητες. Διαχωρίζονται σύμφωνα με τη χημική τους δομή σε μεγάλες ομάδες.

Με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Επίσης, οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες. Συναντώνται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμα και ολιγοσακχαρίτης. Ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων είναι η γλυκόζη αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια<sup>4</sup>. Το μέγεθος όλων αυτών των πολυφαινολών ποικίλει από μικρά μόρια (όπως η φαινόλη), έως πολυμερή (όπως οι ταννίνες) μεγάλου μοριακού βάρους.

Οι πολυφαινόλες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή:

- Φλαβονοειδή. Αποτελούν τη μεγαλύτερη υποομάδα των πολυφαινολών και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, της δράσης τους στην καταπολέμηση των φλεγμονών αλλά και της αντικαρκινικής τους δράσης. Τις λαμβάνουμε κάθε φορά που πίνουμε τσάι, καφέ, που τρώμε κόκκινο λάχανο, ελαιόλαδο και άλλα.
- Φαινολικά οξέα. Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιϊκές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά ολικής άλεσης μας παρέχει επαρκείς ποσότητες από φαινολικά οξέα.

Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φαινολικά οξέα είναι τα μήλα, τα κεράσια, τα ακτινίδια, οι φράουλες, τα κρεμμύδια, το τσάι και άλλα.

- **Ανθοκυανίνες.** Είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που μας παρέχουν προστασία από τις φλεγμονές, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές νόσους. Στην ουσία πρόκειται για τις χρωστικές που δίνουν το λαμπρό κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα στα ρόδια, στα σταφύλια, στα κόκκινα κρεμμύδια, στα μπλε μούρα και άλλα.

- **Στιλβένια.** Με την πιο γνωστή από αυτά την ρεσβερατρόλη, είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρωμάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη. Βρίσκονται στα μούρα, στη φλούδα των σταφυλιών ιδιαίτερα των κόκκινων, στο κρασί και σε άλλες φυτικές ουσίες

- **Λιγνάνες.** Οι λιγνάνες είναι χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά , ιδιαίτερα στο λιναρόσπορο. Το λινάρι είναι ένα φυτό με εντυπωσιακά μωβ λουλούδια που είναι ενδημικά στη Μεσόγειο και την Ινδία. Οι λιγνάνες έχουν χρησιμοποιηθεί στα φυτικά φάρμακα για πολλούς αιώνες<sup>5</sup>.

Οι πολυφαινόλες είναι ως ένα βαθμό υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των φυτικών τροφίμων. Προσδίδουν στα τρόφιμα και στα ποτά την χαρακτηριστική πικρή γεύση και τη στυφότητα. Εμπλέκονται και σε οξειδωτικές μεταβολές οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων.

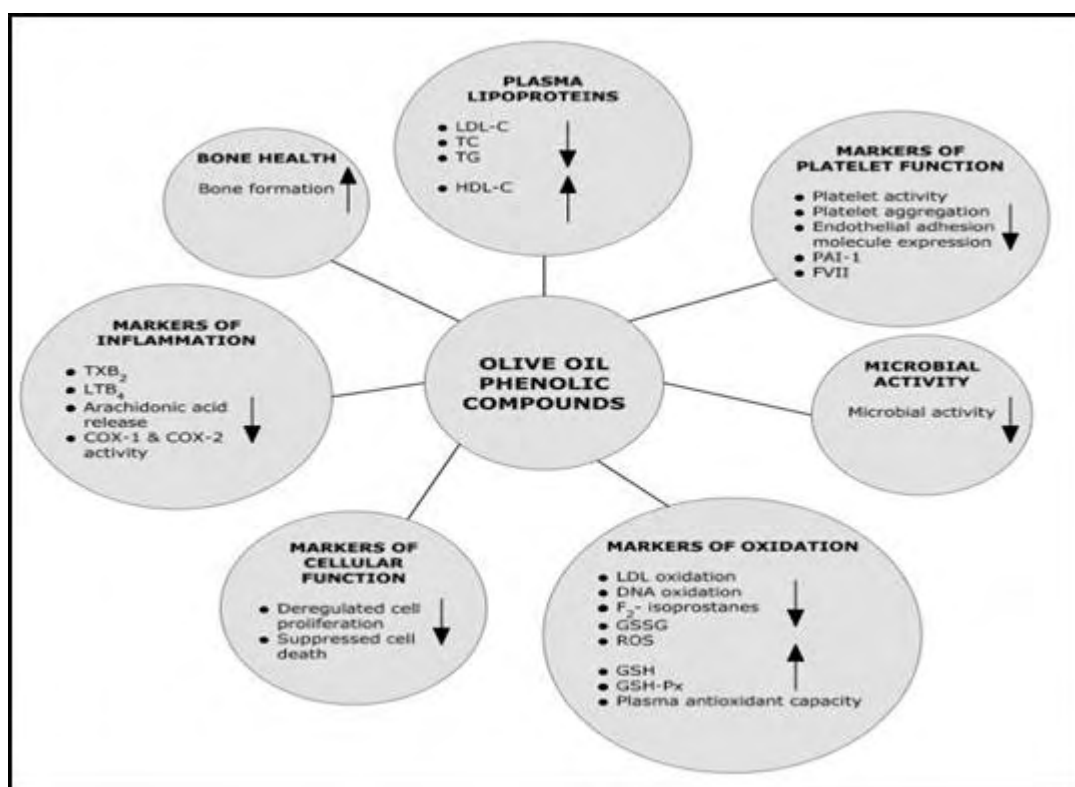
Εκτός από τις ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού παρέχουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμένων μορφών καρκίνου<sup>6</sup>.

Επίσης, οι πολυφαινόλες παίζουν σημαντικό ρόλο και στα φυτά καθώς μπορεί να έχουν αρκετές επιπτώσεις στους φυτικούς ιστούς όπως είναι η καταστολή αυξητικών ορμονών, η προστασία από την UV ακτινοβολία, η προσθήκη χρώματος, η πρόληψη μικροβιακών μολύνσεων και η συμμετοχή σε διαδικασίες ανάπτυξης<sup>7</sup>. Επιπλέον, σε ορισμένα είδη φυτών οι πολυφαινόλες μπορούν να παρέχουν προφύλαξη έναντι της σήψης<sup>8</sup>.

Η τυροσόλη και η υδροxyτυροσόλη, είναι τα κύρια φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στα ΥΑΕ. Υπάρχουν και άλλα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο όπως καφεϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, υδροxyβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, γεντιστικό οξύ, σικιμικό οξύ, φαινυλοξικό και οι ενώσεις θυμόλη, καρβακρόλη και οι φλαβονοειδείς ενώσεις καμφερόλη, απιγενίνη και κερκετίνη.

### 1.3.2. Προστατευτικός ρόλος πολυφαινολών από ΥΑΕ

Ιδιαίτερα για τις πολυφαινόλες οι οποίες βρίσκονται στο ελαιόλαδο και κατ' επέκταση στα υγρά απόβλητα ελαιολιβερίου (ΥΑΕ), διάφορες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, έχουν δείξει ότι τα πολυφαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου έχουν σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες που μπορούν να μειώσουν αποτελέσματα που σχετίζονται με την ανάπτυξη χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών<sup>9</sup>.



Εικόνα 5 Βιολογικές λειτουργίες πολυφαινολικών συστατικών ελαιόλαδου

Οι ωφέλιμες επιδράσεις των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου και των ΥΑΕ είναι οι εξής:

- Στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Αυξημένα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης (TC) και της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης χοληστερόλης (LDL), έχουν καθιερωθεί ως παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση, η οποία είναι η κύρια αιτία της καρδιαγγειακής νόσου. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) πιστεύεται ότι έχουν προστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες<sup>10,11</sup>.

- Στην οξείδωση των λιπιδίων. Η οξείδωση της LDL θεωρείται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και της καρδιαγγειακής νόσου<sup>12</sup>. Η οξείδωση της LDL προκαλεί βλάβη στο αγγειακό τοίχωμα, διεγείροντας την πρόσληψη μακροφάγων και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της πλάκας εντός του αρτηριακού τοιχώματος<sup>13,14</sup>. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα (in vivo) έχουν δείξει ότι το επίπεδο στο οποίο η LDL οξειδώνεται, μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης πολυφαινολών<sup>11,15,16</sup>.

- Στην οξειδωτική καταστροφή του DNA. Η οξειδωτική βλάβη στο DNA είναι ένα πρόδρομο γεγονός για την ανθρώπινη καρκινογένεση και είναι γνωστό ότι ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν συνεχώς τα ανθρώπινα κύτταρα<sup>17</sup>. Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχειδειχθεί πως η πρόσληψη συστατικών ελαιόλαδου πλούσιο σε πολυφαινόλες μειώνει τις βλάβες στο DNA έως και 30% σε σύγκριση με πρόσληψη ελαιόλαδου φτωχού σε πολυφαινόλες<sup>18</sup>.

- Σε δείκτες φλεγμονής. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των δεικτών φλεγμονής στον ορό σχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η θρομβοξάνη B2 του πλάσματος (TXB2) και το λευκοτριένιο B4 (LTB4) είναι γνωστοί ως προ-φλεγμονώδεις παράγοντες. Η TXB2 έχει τη δυνατότητα να αυξήσει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων του αίματος και το LTB4 έχει χημειοστατική επίδραση επί των ουδετερόφιλων, κατευθύνοντας τα κύτταρα σε κατεστραμμένο ιστό<sup>19,20</sup>. Αυτοί οι παράγοντες είναι γνωστό ότι παράγουν τον πόνο, την ερυθρότητα και το οίδημα που σχετίζεται με φλεγμονή. Σε μελέτες που έγιναν βρέθηκε μία μείωση στις συγκεντρώσεις των TXB2 και LTB4 με αυξανόμενη συγκέντρωση πολυφαινολών του ελαιόλαδου<sup>21,22</sup>.

- Στην κυτταρική λειτουργία. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η καταστολή του κυτταρικού θανάτου είναι βασικοί παράγοντες για το σχηματισμό όγκων και την εξέλιξη αυτών<sup>23</sup>. Μελέτες έχουν δείξει ότι η φαινόλη του ελαιόλαδου υδροξυτυροσόλη, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε ανθρώπινα κύτταρα προ-μυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL60 και σε ανθρώπινες σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου. Έρευνες δείχνουν ότι ο β υποδοχέας οιστρογόνου έχει μια προστατευτική επίδραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου και μπορεί να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Ο β υποδοχέας οιστρογόνου είναι ο κύριος υποδοχέας οιστρογόνου και εκφράζεται σε υψηλό επίπεδο από την κανονική βλεννογόνο ανθρώπινου εντέρου. Σε ένα καρκινικό κόλον, ωστόσο, η έκφραση του β υποδοχέα οιστρογόνου μειώνεται και συνδέεται με την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλούν οι πολυφαινόλες του παρθένου ελαιόλαδου, οι οποίες δρουν σαν αντικαρκινικοί παράγοντες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αυτό συμβαίνει επειδή οι περισσότερες φαινόλες έχουν χημική δομή παρόμοια με αυτήν της 17 β-οιστραδιόλης (κύρια μορφή του οιστρογόνου στον άνθρωπο) και μπορούν να είναι προστατευτικές έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου ενεργώντας ως εκλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα οιστρογόνου<sup>24</sup>.

- Στη μικροβιακή δραστηριότητα. In vitro έρευνες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις στο λάδι, έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ιδιαίτερα, οι φαινολικές ενώσεις ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη έχουν δείξει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση εναντίων πολλών στελεχών βακτηρίων τα οποία είναι υπεύθυνα για εντερικές και αναπνευστικές λοιμώξεις<sup>25</sup>.

#### 1.4.Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου

Κατά την κατεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιουργεία, παράλληλα με το ελαιόλαδο, παράγεται και μία σειρά υποπροϊόντων. Αυτά είναι:

- ο ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού (κυρίως του κουκουτσιού),
- τα ελαιόφυλλα, που έχουν μεταφερθεί με τον ελαιόκαρπο και

- μία σημαντική σε όγκο και οργανικό φορτίο ποσότητα υγρών αποβλήτων, που είναι γνωστά ως "λιοζούμι", "κατσίγαρος" ή "μούργα".

Ο κατσίγαρος συνίσταται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και από το νερό που χρησιμοποιείται στις διάφορες φάσεις παραγωγής του λαδιού στο ελαιουργείο. Πρόκειται για ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μία σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολύ-αλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαίου. Η άμεση επίπτωση του κατσίγαρου στο περιβάλλον είναι η αισθητική υποβάθμιση που προκαλεί και η οποία οφείλεται στην έντονη οσμή του και στο σκούρο χρώμα του. Παράλληλα, εξαιτίας του υψηλού οργανικού φορτίου που περιέχει, είναι πιθανόν να δημιουργήσει ευτροφικά φαινόμενα σε περιπτώσεις που καταλήγει σε αποδέκτες με μικρή ανακυκλοφορία νερών (κλειστούς θαλάσσιους κόλπους και λίμνες).

Τα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων (ΥΑΕ), αν και υποπροϊόντα επεξεργασίας του ελαιοκάρπου, συγκαταλέγονται βεβαρημένα από πλευράς ρυπαντικού φορτίου γεωργικά βιομηχανικά απόβλητα. Συγκεκριμένα, ένα μεσαίου μεγέθους ελαιολιβερίο, παράγει περίπου 1.000 tn. απόβλητα ανά περίοδο συγκομιδής ελαιοκάρπου, με οργανικό φορτίο το οποίο ισοδυναμεί με τα ετήσια απόβλητα μιας πόλης 30.000 κατοίκων.

### 1.5.Ελεύθερες ρίζες

Με τον όρο "ελεύθερες ρίζες" αναφερόμαστε σε μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους<sup>26</sup>. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια<sup>27,28</sup>.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να



οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό<sup>29,30</sup>.

Για τις ελεύθερες ρίζες συχνά χρησιμοποιείται γενικά ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS). Ο όρος περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ), του υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ), του αλκοξυλίου ( $RO^{\bullet}$ ) και του υδροπεροξυλίου ( $HO_2^{\bullet}$ ). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου ( $CCl_3^{\bullet}$ ), οι θειούχες ρίζες ( $RS^{\bullet}$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $COCl$ ). Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο, όπως το μονοξείδιο του αζώτου ( $NO^{\bullet}$ ) και το διοξείδιο του αζώτου ( $NO_2^{\bullet}$ ) καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες [π.χ. το νιτρώδες οξύ ( $HNO_2$ ) και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ( $ONOO^-$ )]<sup>29,31</sup>.

Υπάρχουν τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών. Οι ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν εκείνες που παράγονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενεργώντας μέσα στο κύτταρο και εκείνες που σχηματίζονται στο εσωτερικό του κυττάρου και απελευθερώνονται στη γύρω περιοχή. Τέτοιες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση<sup>32-36</sup>, τα ουδετερόφιλα και η αναπνευστική «έκρηξη»<sup>37,38</sup>, η οξειδάση της ξανθίνης<sup>39,40</sup>, το κυτόχρωμα P450<sup>30,41,42</sup> και η αυτοοξείδωση μορίων (φλαβόνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη).

Στις εξωγενείς πηγές συμπεριλαμβάνονται η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα<sup>43,44</sup>. Επίσης, ελεύθερες ρίζες παράγονται από τη δράση φαρμάκων<sup>45,46</sup> και άλλων ξеноβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα αλλά και από το αλκοόλ<sup>47-50</sup>. Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι επίσης η διατροφή<sup>51-53</sup>.

## 1.6.Βιολογική δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου

### 1.6.1. Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι, έχουν δηλαδή την ικανότητα να μεταφέρουν σήματα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια μεταξύ των κυττάρων<sup>27,54–57</sup>. Συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης<sup>58</sup>. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

Επιπλέον, οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ενζυμική ενεργοποίηση, την αποτοξικοποίηση φαρμάκων και την αναπλήρωση του γλυκογόνου<sup>59</sup>. Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

### 1.6.2. Αρνητικές επιδράσεις

Παρά τις επωφελείς επιδράσεις, οι ROS έχουν και κάποιες αρνητικές επιδράσεις καθώς αλλάζουν το μέγεθος και το σχήμα των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρούν<sup>60</sup>. Συνεπώς, οι ROS μπορούν να επάγουν την απόπτωση σε υγιή κύτταρα, να προκαλέσουν φλεγμονή και να αλλοιώσουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Όλες οι παραπάνω αλλοιώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε εκφυλιστικές ασθένειες, όπως καταρράκτης, καρκίνος, νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer και καθώς και γήρανση<sup>61</sup>. Επίσης, οι ROS προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA).

## 1.7.Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

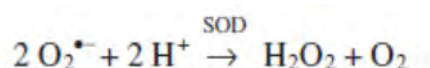
Ως αντιοξειδωτικό, ορίζεται η ουσία που βοηθάει στη μείωση της σοβαρότητας του οξειδωτικού στρες, είτε σχηματίζοντας λιγότερο δραστικές ρίζες είτε επιδιορθώνοντας τις βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες<sup>62</sup>. Ένας αριθμός αντιοξειδωτικών είναι ενεργά στον οργανισμό και συμπεριλαμβάνουν τόσο ενζυμικά όσο και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά<sup>63</sup>. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνουν την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την καταλάση (CAT), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και την αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

Τα μη ενζυμικά συμπεριλαμβάνουν τη βιταμίνη Α (ρετινόλη), τη βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), τη βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή, τις θειόλες [γλουταθειόνη (GSH), ουρικό οξύ, συνένζυμο Q10, φερριτίνη, χολερυθρίνη] και μικροσυστατικά (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, σελήνιο, μαγνήσιο) τα οποία λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες.

### 1.7.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί

#### 1.7.1.1. Υπεροξειδική δισμουτάση

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι η κύρια άμυνα απέναντι στις ρίζες σουπεροξειδίου και είναι η πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $O_2^{\bullet -}$  σε  $H_2O_2$  :



Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές SOD (SOD1, SOD2, SOD3) και όλες απαιτούν ένα οξειδοαναγωγικό δραστικό μέταλλο μεταπτώσεως στην ενεργή θέση για να πραγματοποιηθεί η καταλυτική διάσπαση του ανιόντος σουπεροξειδίου<sup>64,65</sup>. Δύο από τις ισομορφές SOD βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενώ η τρίτη βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο<sup>65</sup>. Η SOD<sub>1</sub> απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο ως συμπαράγοντα και κατά κύριο λόγο βρίσκεται στο κυτοσόλιο και στον μιτοχονδριακό ενδιάμεσο χώρο. Η SOD<sub>2</sub> χρησιμοποιεί μαγνήσιο σαν συμπαράγοντα και βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Τέλος, η SOD<sub>3</sub> απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο σαν συμπαράγοντα και βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο.

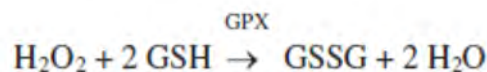
#### 1.7.1.2. Καταλάση

Η καταλάση (CAT) είναι παρούσα σε κάθε κυτταρικό τύπο και ιδιαίτερα στα υπεροξειδιοσώματα, κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν οξυγόνο με σκοπό να αποτοξικοποιήσουν τοξικές ουσίες και παράγουν  $H_2O_2$ <sup>66</sup>. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Καταλύει την μετατροπή του  $H_2O_2$  σε νερό και οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



### 1.7.1.3. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

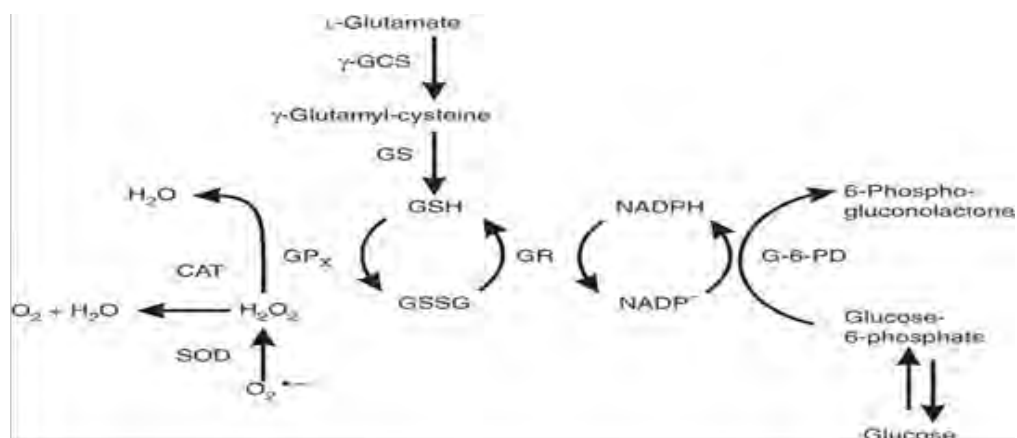
Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί πέντε είδη υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης<sup>67,68</sup>. Η GPX καταλύει την αναγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή του οργανικού υδροϋπεροξειδίου (ROOH) σε νερό (H<sub>2</sub>O) και αλκοόλη, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας την GSH ή σε κάποιες περιπτώσεις την θειορεδοξίνη ή την γλουταρεδοξίνη ως δότη ηλεκτρονίων<sup>69-71</sup>. Όταν η GSH είναι ο δότης ηλεκτρονίων, οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης.



Η ποικιλία στην ειδικότητα των υποστρωμάτων και την κυτταρική θέση καθιστούν την GPx ως ένα ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο. Το γεγονός ότι πολλά ισόενζυμα GPx ανάγουν μια μεγάλη ποικιλία υδροϋπεροξειδίων, κάνει την GPx ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό για την προστασία των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων από βλάβες προερχόμενες από ROS.

### 1.7.1.4. Αναγωγάση της γλουταθειόνης

Η αναγωγάση της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε GSH και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα.



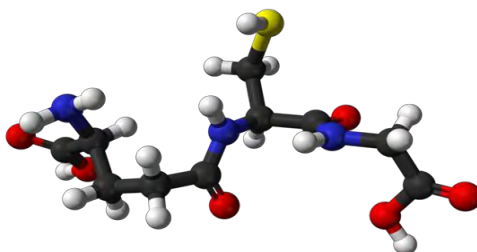
Εικόνα 6 Απεικόνιση της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR).

Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.

### 1.7.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

#### 1.7.2.1. Γλουταθειόνη

Είναι η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική πηγή θειόλης στο κύτταρο και οι συγκεντρώσεις της στους περισσότερους ιστούς είναι στην κλίμακα των millimolar. Η GSH εξυπηρετεί πολλές λειτουργίες κατά την προστασία των ιστών από οξειδωτική βλάβη και τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος σε ανηγμένη κατάσταση<sup>72</sup>. Η GSH ανάγει το υδρογόνο και τα οργανικά υπεροξείδια μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την GPx, εξουδετερώνει την  $\text{OH}\cdot$  και το  $^1\text{O}_2$  και ανάγει τις ρίζες τοκοφερόλης εμποδίζοντας επομένως τη λιπιδική υπεροξείδωση<sup>73</sup>.

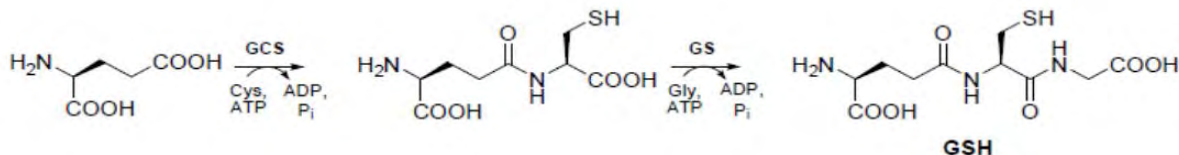


Εικόνα 7 Δομή Γλουταθειόνης

Η GSH εκτός από αντιοξειδωτική δράση επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες:

1. Η GSH συζεύγνυται με το NO για να σχηματίσει S-νιτροζογλουταθειόνη, το οποίο διασπάται από το σύστημα θειορεδοξίνης για να απελευθερώσει GSH και  $\text{NO}^{31}$ .
2. Χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την αφυδρογονάση της φορμαλδεΐδης, η οποία μετατρέπει την φορμαλδεΐδη και την GSH σε S-φόρμυλο-γλουταθειόνη<sup>74</sup>. Η απομάκρυνση της φορμαλδεΐδης (ένα καρκινογόνο) είναι φυσιολογικής σημασίας επειδή παράγεται από το μεταβολισμό της μεθειονίνης, της χολίνης, της μεθανόλης, της σαρκosίνης και των ξενοβιοτικών ουσιών.
3. Η GSH είναι απαραίτητη για τη μετατροπή της προσταγλανδίνης  $\text{H}_2$  σε προσταγλανδίνες  $\text{D}_2$  και  $\text{E}_2$  από την ισομεράση του ενδοϋπεροξειδίου<sup>75</sup>.

4. Η GSH συμμετέχει στο σύστημα της γλυοξυλάσης, η οποία μετατρέπει την μεθυλογλυοξυλάση σε D-γαλακτικό, ένα μονοπάτι δραστικό σε μικροοργανισμούς.



Εικόνα 8 Βιοσύνθεση Γλουταθειόνης

Επαρκείς συγκεντρώσεις GSH είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των λεμφοκυττάρων και των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων<sup>76</sup>. Επιπλέον, η GSH είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων καθώς και την παραγωγή κυτοκινών. Η GSH μπορεί να συντεθεί τόσο από ενδογενή όσο και από αμινοξέα της διατροφής, αλλά μόνο το ήπαρ συμβάλει σε σημαντική *de novo* σύνθεση της.

#### 1.7.2.2. Βιταμίνη Α

Η βιταμίνη Α είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη παρούσα σε πολλές λιπιδικές ουσίες. Το β-καροτένιο, παρόν σε κυτταρικές μεμβράνες, μετατρέπεται σε βιταμίνη Α όταν ο οργανισμός το χρειάζεται. Αν και ο μηχανισμός της *in vivo* δράσης δεν είναι ξεκάθαρος, το β-καροτένιο απενεργοποιεί τις ROS (ιδιαίτερα το  $^1\text{O}_2$  και λιπιδικές ρίζες) και μειώνει τη λιπιδική υπεροξείδωση<sup>63,77</sup>. Αν και λιγότερο σημαντική από τη βιταμίνη Ε, η βιταμίνη Α και το β-καροτένιο ενεργούν από κοινού με τη βιταμίνη C και τη βιταμίνη Ε με σκοπό να προστατεύσουν τα κύτταρα από τις ROS<sup>78</sup>.

#### 1.7.2.3. Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στα εξωκυττάρια υγρά αλλά είναι αποτελεσματική και στο κυτταρόπλασμα<sup>79,80</sup>. Η βιταμίνη C είναι πιο άφθονη σε ιστούς όπου η παραγωγή ROS είναι πιο σημαντική. Αυτό το φαινόμενο ορίζεται ως προσαρμογή απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Στα εξωκυττάρια υγρά, η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει ROS ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{LOO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ )<sup>79</sup>. Η βιταμίνη C έχει επίσης την ικανότητα να παγιδεύει ιόντα χαλκού, τα οποία έχουν πολύ ισχυρή οξειδωτική δράση.

#### 1.7.2.4. Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που αποτελείται από πολλές ισομορφές, γνωστές ως τοκοφερόλες. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή και άφθονη μορφή<sup>81</sup>. Η βιταμίνη Ε είναι γνωστή ως ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό λόγω της αφθονίας της στα κύτταρα και τις μιτοχονδριακές μεμβράνες και λόγω της ικανότητάς της να αντιδρά απευθείας με τις ROS<sup>82</sup>. Αλληλεπιδρά με πολυάριθμα αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη C, GSH, β-καροτένιο ή λιποϊκό οξύ, τα οποία έχουν την ικανότητα να αναγεννούν τη βιταμίνη Ε από την οξειδωμένη της μορφή<sup>83</sup>. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες καθώς σταματάει τη λιπιδική υπεροξείδωση. Η μοριακή δομή της διευκολύνει την απενεργοποίηση των ROS σε ένα λιπιδικό περιβάλλον, ιδιαίτερα τις ρίζες υπεροξυλίου που προέρχονται από την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL)<sup>84,85</sup>.

#### 1.7.2.5. Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν μεταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους<sup>86-88</sup>. Η έντονη φυσική δραστηριότητα αυξάνει τις συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος στο πλάσμα. Το ουρικό οξύ του πλάσματος διαχέεται στους μύες με σκοπό να τους προστατεύσει από οξείδωση προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες<sup>89</sup>. Πράγματι, το ουρικό οξύ στο πλάσμα και τον μυ, είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά με άμεσες επιδράσεις στο  $^1\text{O}_2$ , το HOCL, τις ρίζες υπεροξυλίου, το ONOO- ή το όζον ( $\text{O}_3$ )<sup>89-92</sup>. Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι το ουρικό οξύ αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό κομμάτι (>50%) της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος<sup>91</sup>. Έτσι, το ουρικό οξύ προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες, το υαλουρονικό οξύ και το DNA από οξείδωση. Μια άλλη σημαντική αντιοξειδωτική ιδιότητα του ουρικού οξέος είναι η ικανότητά του να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου. Αυτή η διαδικασία εμποδίζει τον  $\text{Fe}^{3+}$  να δράσει προ-οξειδωτικά, την οξείδωση της βιταμίνης C και τη λιπιδική υπεροξείδωση<sup>93,94</sup>.

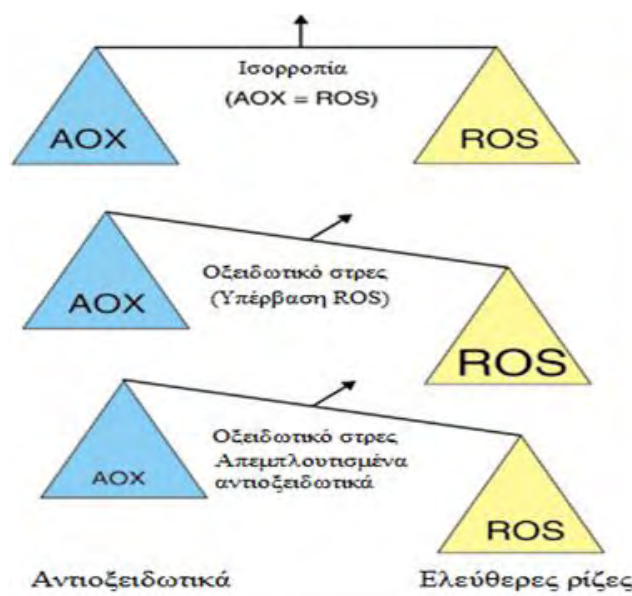
#### 1.7.2.6. Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 (CoQ10) είναι ένα ενδογενές μόριο το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση ATP και είναι παρόν στη μιτοχονδριακή μεμβράνη<sup>57,95</sup>. Το CoQ10 είναι

γνωστό ότι ενεργεί ως αντιοξειδωτικό με άμεση δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου ή με έμμεση δράση αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E<sup>96,97</sup>. Το CoQ10 έχει επίσης ωφέλιμες επιδράσεις, όπως η προστασία απέναντι σε καρδιαγγειακές ασθένειες, καρκίνο και κυτταρική γήρανση ή απόπτωση.

### 1.8. Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην κατάσταση σοβαρής ανισορροπίας μεταξύ των ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας. Ο Sies, ο οποίος εισήγαγε τον όρο από τον τίτλο του βιβλίου που εκδόθηκε το 1985, πρότεινε έναν ορισμό το 1991 στην εισαγωγή της δεύτερης έκδοσης ως “η διαταραχή ανάμεσα στην προ οξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία υπέρ της πρώτης, οδηγώντας σε ενδεχόμενη βλάβη”.



Εικόνα 9 Σχηματική απεικόνιση οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών είτε από αυξημένη παραγωγή ROS/RNS.

Σε κυτταρικό επίπεδο, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια), παράλληλα οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, αλλοιώνοντας έτσι τη σηματοδότηση, ενώ αν οι βλάβες είναι εκτεταμένες οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση.



Οι πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και γενικότερα άμεση και έμμεση καταστροφή. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών.

Το DNA, οι τροποποιήσεις των βάσεων, οι θραύσεις των αλυσίδων του, οι καταστροφές στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης και οι βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του, είναι μερικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες που μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις.

Ως προς τον κυτταρικό θάνατο το κύτταρο οδηγείται εκεί σε περίπτωση εκτεταμένων βλαβών είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Κατά τη νέκρωση το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον επηρεάζοντας και τα γειτονικά κύτταρα. Στην απόπτωση τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.

Σε επίπεδο οργάνων και οργανισμού, το οξειδωτικό στρες είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με πολλές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των κυτταρικών επιδράσεων του στρες.

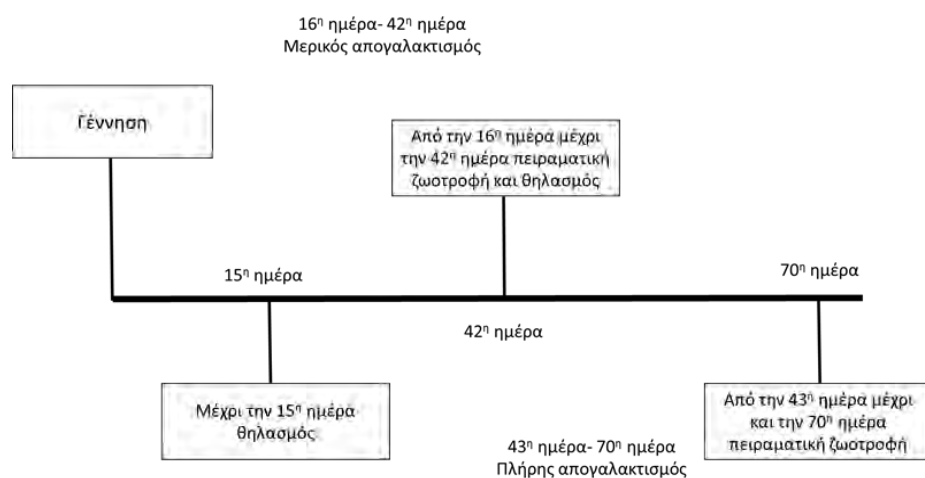
## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, στοχεύει στην αξιοποίηση των υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών υψηλής προστιθέμενης αξίας που θα χορηγηθούν σε πρόβατα νεαρής ηλικίας, με σκοπό την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής τους άμυνας και κατά συνέπεια την βελτιστοποίηση της ευζωίας τους και την αύξηση της ζωικής παραγωγής. Επιπλέον, η επεξεργασία των ρυπογόνων υγρών απόβλητων των ελαιοτριβείων, θα οδηγήσει στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

Για το σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε εκτροφή νεαρών προβάτων στο Ινστιτούτο Επιστήμης και Ζωικής Παραγωγής στα Γιαννιτσά Πέλλας, με εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης και ανάπτυξης. Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο και ο τρόπος θανάτωσής τους για τη λήψη αίματος και ιστών έγιναν σύμφωνα με τις Οδηγίες 2010/63/ΕΕ του Ε. Κ. και του Συμβουλίου της 22/10/2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

Για την παρούσα εργασία εκτράφηκαν 28 πρόβατα της Ελληνικής φυλής «Χιώτικα» τα οποία μέχρι τις 15 ημέρες από τη γέννησή τους, παρέμειναν με τις μητέρες τους για θηλασμό και στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, Α και Β, με 12 πρόβατα ανά ομάδα, σε ομαδικά κελιά. Είχαν ταυτόχρονη πρόσβαση σε πειραματικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) και μηδική (τριφύλλι), για κατανάλωση κατά βούληση. Η ομάδα Α αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, που λάμβανε σύννηθες σιτηρέσιο ανάπτυξης ενώ η ομάδα Β λάμβανε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα μείγματος αραβόσιτου και εκχύλισμα Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), σε αντικατάσταση του καρπού αραβόσιτου. Τα πειραματικά σιτηρέσια ήταν ισοενεργά, ισοπρωτεϊνικά, και ισορροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων προβάτων. Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το παρακάτω πειραματικό πλάνο.



Διάγραμμα 1 Πειραματικό πλάνο εκτροφής προβάτων

Μετά το πέρας των 15 ημερών από την γέννηση, τα πρόβατα βρίσκονταν με τις μητέρες τους. Στο διάστημα 15-42 ημερών τα πρόβατα θήλαζαν και ταυτόχρονα

έτρωγαν τις πειραματικές ζωοτροφές. Τα πρόβατα απομακρύνονταν από τις μητέρες τους μια ώρα το πρωί και μια ώρα το απόγευμα για να πραγματοποιηθεί η σίτιση των μητέρων. Τις υπόλοιπες ώρες τα πρόβατα θήλαζαν και τρέφονταν με τις πειραματικές ζωοτροφές οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε ειδικές ταΐστρες. Στο διάστημα μεταξύ 42-70 ημερών, στο οποίο ολοκληρώθηκε ο πειραματισμός, απομακρύνθηκαν οι μητέρες και τα πρόβατα τρέφονταν αποκλειστικά με τις πειραματικές ζωοτροφές καθώς και με μηδική τροφή.

Ιστοληψία πραγματοποιήθηκε στις 42 και 70 ημέρες. Οι σφαγές πραγματοποιήθηκαν από εξειδικευμένο προσωπικό στο σφαγείο του Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής Γιαννιτσών ακολουθώντας τους απαραίτητους κανονισμούς περί χειρισμού, μεταφοράς και θανάτωσης εργαστηριακών ζώων, που πραγματοποιήθηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα ζώα να υποστούν την λιγότερη καταπόνηση καθώς και λιγότερο άγχος. Πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένη ηλικία των ζώων με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στην ευζωία, δηλαδή κατά τον απογαλακτισμό και τέλος, την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στο τελικό βάρος (βάρος σφαγίου). Με το πέρας των ιστοληψιών ακολούθησε , κρυοπηξία των δειγμάτων με υγρό άζωτο στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους -80°C για μετέπειτα επεξεργασία. Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των ιστών και στη συνέχεια ακολούθησε η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες.

### 3.1. Παραγωγή σιτηρεσίου

#### 3.1.1. Εισαγωγή

Ενσίρωση είναι η διαδικασία ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό ποσοστό υγρασίας και υπό αναερόβιες συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση του προϊόντος αλλά και τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας, για χρήση ως ζωοτροφή. Κατά την ενσίρωση δημιουργούνται όξινες συνθήκες που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης τους .

Για την ενσίρωση επιλέγονται φυτά με ψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, σε ξηρή ουσία υψηλής πεπτικότητας και ικανοποιητικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Τα πιο κατάλληλα φυτά που προσφέρονται για ενσίρωση είναι το καλαμπόκι και η μηδική. Για την παρασκευή του πολυφαινολικού σιτηρεσίου έπρεπε αρχικά να παρασκευαστεί ενσιρωμένο καλαμπόκι. Το ενσιρωμένο καλαμπόκι περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή.

Τα βακτήρια τα οποία είναι παρόντα στην καλλιέργεια εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες. Αυτά που είναι επιθυμητά και τα ανεπιθύμητα. Τα επιθυμητά βακτήρια είναι αυτά που μπορούν και μετατρέπουν υδατάνθρακες σε γαλακτικό οξύ και είναι συνήθως στελέχη των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* και *Streptococcus*. Είναι αναερόβια βακτήρια και πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλη την καλλιέργεια.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται από τα βακτήρια είναι ταχύτερη με την κοπή του χόρτου και την ταχεία εδραίωση του αποκλεισμού του αέρα. Το γαλακτικό οξύ είναι ένα ισχυρό οργανικό οξύ και η γρήγορη παραγωγή του στο ενσιρωμένο χόρτο οδηγεί σε ένα χαμηλό pH και σε συνθήκες οι οποίες θα παρεμποδίζουν την παραγωγή βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ και πολλών ακόμα βακτηρίων. Αυτή η αντίδραση είναι γνωστή ως μία διεργασία καθαρισμού και το pH το οποίο προκύπτει εξαρτάται από την περιεκτικότητα της τροφής σε υγρασία. Αν η τροφή περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας τότε το pH πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό και να παραχθεί πολύ μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος.

Για το ενσίρωμα τα βακτήρια γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιούνται ζυμώνουν τους υδατοδιαλυτούς υδατάνθρακες (WSC) στην καλλιέργεια σε γαλακτικό οξύ, και σε μικρότερο βαθμό σε οξικό οξύ, παράγοντας ταυτόχρονα διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Η μείωση του pH του ενσιρωμένου υλικού οφείλεται στην παραγωγή αυτών των οξέων με αποτέλεσμα την αναστολή των μικροοργανισμών αλλοίωσης της τροφής. Η διαδικασία ενσίρωσης μπορεί να διαιρεθεί σε 4 φάσεις:

### Φάση 1<sup>η</sup> : Αερόβια Φάση

Η φάση αυτή συνήθως διαρκεί μόνο λίγες ώρες στις οποίες το ατμοσφαιρικό οξυγόνο μειώνεται λόγω της αναπνοής του φυτικού υλικού αλλά και των αερόβιων και προαιρετικά αερόβιων μικροοργανισμών, όπως ζύμες και εντεροβακτήρια. Επιπλέον, τα φυτικά ένζυμα όπως πρωτεάσες αλλά και ένζυμα που διασπούν υδατάνθρακες είναι ενεργά κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, εφόσον το pH εξακολουθεί να είναι εντός του φυσιολογικού εύρους για φρέσκο ενσίρωμα (pH 6.5-6.0).

### Φάση 2<sup>η</sup> : Φάση Ζύμωσης

Αυτή η φάση ξεκινά όταν η ενσίρωση γίνεται αναερόβια, και συνεχίζεται για αρκετές ημέρες έως αρκετές εβδομάδες, ανάλογα με τις ιδιότητες των προς ενσίρωση τροφών και τις συνθήκες αποθήκευσης τους. Αν η ζύμωση προχωρά με επιτυχία, αναπτύσσονται τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, και γίνονται ο κυρίαρχος πληθυσμός κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης. Λόγω της παραγωγής γαλακτικού και άλλων οξέων το pH μειώνεται σε 3,8 - 5,0.

### Φάση 3<sup>η</sup> : Σταθερή Φάση

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί της φάσης 2 σιγά-σιγά μειώνονται σε αριθμούς. Μερικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στο οξύ επιβιώνουν σε αυτή τη φάση σε μια σχεδόν ανενεργή κατάσταση, άλλοι, όπως clostridia και bacilli επιβιώνουν ως σπόρια. Μόνο μερικές πρωτεάσες και καρβοϋδράσες, οι οποίες είναι ανθεκτικές στο οξύ και κάποιοι εξειδικευμένοι μικροοργανισμοί, όπως Lactobacillus buchneri συνεχίζουν να είναι ενεργοί σε χαμηλό επίπεδο.

### Φάση 4<sup>η</sup> : Αερόβια Φάση Αλλοίωσης

Η φάση αυτή ξεκινά αμέσως μόλις το ενσίρωμα εκτεθεί στον αέρα. Κατά τη διάρκεια της χορήγησης του ενσιρώματος στην τροφή των ζώων αυτό είναι αναπόφευκτο, αλλά μπορεί να έχει ήδη ξεκινήσει νωρίτερα λόγω βλάβης του καλύμματος αποθήκευσης του ενσιρώματος. Η διαδικασία της αλλοίωσης μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια. Η έναρξη της φθοράς μπορεί να οφείλεται στην

αποικοδόμηση των οργανικών οξέων, που συμβάλλουν στην διατήρηση, από ζύμες και περιστασιακά βακτήρια οξικού οξέος. Αυτό θα προκαλέσει μια αύξηση στο pH, και ως εκ τούτου το δεύτερο στάδιο της αλλοίωσης, το οποίο συνδέεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και την ενεργοποίηση των μικροοργανισμών αλλοίωσης όπως βάκιλλοι. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει επίσης τη δραστηριότητα πολλών άλλων (προαιρετικά) αερόβιων μικροοργανισμών, όπως μύκητες και εντεροβακτήρια. Αερόβια αλλοίωση συμβαίνει σε όλες σχεδόν τις αποθηκεύσεις που έχουν ανοιχτεί και εκτίθενται στον αέρα. Ωστόσο, το ποσοστό της αλλοίωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον αριθμό και την δραστηριότητα των οργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στο ενσίρωμα.

Η είσοδος του αέρα κατά τη διαδικασία της ζύμωσης μπορεί να καθυστερήσει ή ακόμη και να εμποδίσει την επίτευξη σωστών επιπέδων pH. Αυτό θα οδηγήσει σε υπερβολική χρήση μεγάλων ποσοτήτων υδατανθράκων η οποία θα μειώσει την αξία θρεπτική αξία της ενσίρωμένης τροφής. Είσοδος του αέρα αφού η διαδικασία της ενσίρωσης έχει φτάσει σε σταθερή κατάσταση θα οδηγήσει σε απώλεια της σταθερής κατάστασης μέσω αναπνοής και τη περεταίρω μείωση των υδατανθράκων. Αυτό θα μικρύνει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος.

Όταν η ενσίρωση ενσωματώνεται σε ένα σύστημα καλλιέργειας, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την παραγωγικότητα και την αποτελεσματικότητα χρησιμοποίησης των διαθέσιμων πόρων. Σε γενικές γραμμές, με τη χορήγηση ενσιρώματος αυξάνεται η παραγωγικότητα των ζώων, λόγω καλύτερης διατροφής και συνδυάζεται η γεωργική με την κτηνοτροφική κατεύθυνση της επιχείρησης.

### 3.1.2. Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος

Ένα καλό ενσίρωμα διαθέτει ένα ανοικτό καφέ στο χρώμα, έχει μια έντονη γεύση και μυρίζει ελάχιστα όταν το γαλακτικό οξύ που περιέχει βρίσκεται στην σωστή ποσότητα. Είναι πολύ σταθερό και μπορεί να διατηρηθεί για χρόνια, εάν απαιτείται υπό την προϋπόθεση ότι το οξυγόνο περιορίζεται από το υλικό. Για την καλύτερη ζύμωση, η ξηρά τροφή που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Η κοπή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί όταν το περιεχόμενό τους σε υδατάνθρακες (διαλυτά σάκχαρα)

είναι υψηλό και όταν το φυτό μπορεί να μαραθεί γρήγορα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3% κατά την κοπή και το φυτό θα πρέπει να μαραθεί έως ότου η περιεκτικότητά του σε υγρασία από 80% κατέβει στο 70-75%. Σε αυτό το ποσοστό εξασφαλίζεται η υψηλότερη περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία και η ασφαλέστερη ενσίρωση. Συνήθως το κατάλληλο pH για ένα καλό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο από 4,1.

### 3.1.3. Παρασκευή πολυφαινολικού σιτηρεσίου

Τα Υγρά Απόβλητα χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ενσιρώματος αραβοσίτου. Το ενσίρωμα παρασκευάστηκε πριν από τη δημιουργία των ζωοτροφών και η σύστασή του αποτελούνταν από: καλαμπόκι (αραβόσιτος), ΥΑΕ και νερό. Η αναλογία των συστατικών ήταν τέτοια ώστε το τελικό ενσίρωμα να έχει ποσοστό στερεών 60% και υγρασίας 40 %. Για να επιτευχθεί αυτό, πριν την ανάμιξη των υλικών, συνυπολογίστηκαν τα ποσοστά υγρασίας του αραβόσιτου και των ΥΑΕ. Κατά την παρασκευή του ενσιρώματος προστέθηκαν γαλακτικά βακτήρια που σε αναερόβιες συνθήκες προκαλούν ζύμωση.

Για την υποβοήθηση της γαλακτικής ζύμωσης, χρησιμοποιήθηκε στάνταρ εμπορικό σκεύασμα γαλακτικών βακτηρίων που διαλυόταν σε νερό και μετά από μία διαδικασία αναγέννησης γινόταν η προσθήκη του στο υγρό που αναμιγνυόταν με το καλαμπόκι σε κάθε παρτίδα παραγωγής ενσιρώματος. Ζυγίζονταν 1gr σκόνης λυοφιλιωμένων βακτηρίων για κάθε 100 κιλά τελικού ενσιρωμένου προϊόντος. Τα βακτήρια αυτά στην συνέχεια διαλυόταν σε νερό βρύσης μέσω ανάδευσης και θέρμανσης στους 40°C σε αναλογία 1/10 w/v, με σκοπό να είναι πλήρως ενεργοποιημένα πριν από την προσθήκη τους στο υγρό της ενσίρωσης. Μετά την προσθήκη της καλλιέργειας και την ανάμιξη, το προς ενσίρωση μίγμα τοποθετήθηκε σε ειδικές αεροστεγείς πλαστικές σακούλες, από τις οποίες τραβήχτηκε ο αέρας, μέσω μηχανήματος που δημιουργεί κενό και κλειστήκαν με θερμοσυγκόλληση αεροστεγώς με χρήση ειδικού μηχανήματος. Μετά την σφράγιση των σακούλων που περιείχαν το προς ενσίρωση υλικό, το υλικό που βρισκόταν υπό κενό άρχισε με την βοήθεια των λακτοβάκιλλων που είχαν προστεθεί σ' αυτό να ζυμώνεται με ταυτόχρονη παραγωγή γαλακτικού οξέος και διοξειδίου του άνθρακα το οποίο διόγκωνε τις πλαστικές σακούλες. Για το λόγο αυτό και για να αποτραπεί η διάρρηξη



των σακουλιών και η δημιουργία αερόβιων συνθηκών που δεν ευνοούν την γαλακτική ζύμωση, κάθε δύο με τρεις ημέρες το υλικό υφίστατο εκ νέου συσκευασία σε πλαστικές νέες πλαστικές σακούλες κατά τον ίδιο τρόπο και πάλι υπό κενό. Το pH των δύο τύπων ενσιρωμάτων A (Control) και B (Polyphenolic), μετρούνταν σε επίπεδο εβδομάδας μετά από 1:10 αραίωση του ενσιρώματος με απεσταγμένο νερό.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του pH παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα:

Silage Sample Code	pH			
	Day 0	Day 7	Day 15	Day 21
A (Control Group)	6,20	4,94	4,44	4,08
B (Polyph. Group)	5,19	4,02	4,04	3,96

Πίνακας 1 Αποτελέσματα μετρήσεων pH

Για τις ανάγκες του πειράματος, παρασκευάστηκαν δυο διαφορετικά σιτηρέσια. Κανονικό σιτηρέσιο (χορήγηση στην ομάδα Α-ομάδα ελέγχου-control) και σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με ενσίρωμα από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (χορήγηση στην ομάδα Β-πολυφαινολική). Τα σιτηρέσια ήταν ισοενεργειακά, ισοπρωτεϊνικά και ισορροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων προβάτων. Η σύστασή τους περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ ΠΡΙΝ ΤΟΝ ΑΠΟΓΑΛΑΚΤΙΣΜΟ			
ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ		ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ ΟΜΑΔΑΣ ΥΑΕ	
ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%	ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%
ΚΑΡΠΟΣ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ	45	ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ & ΥΑΕ	45
ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	9	ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	9
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21
ΓΑΛΑ	20	ΓΑΛΑ	20
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5	ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5
ΑΛΑΣ	0,5	ΑΛΑΣ	0,5
ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2	ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2
ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8	ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8

Πίνακας 3 Σιτηρέσιο πριν τον απογαλακτισμό

ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΑΠΟΓΑΛΑΚΤΙΣΜΟ			
ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ		ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ ΟΜΑΔΑΣ ΥΑΕ	
ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%	ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%
ΚΑΡΠΟΣ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ	45	ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ & ΥΑΕ	45
ΚΑΡΠΟΣ ΣΙΤΟΥ	13	ΚΑΡΠΟΣ ΣΙΤΟΥ	13
ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	15	ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	15
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	18	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	18
ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ	4	ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ	4
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5	ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5
ΑΛΑΣ	0,5	ΑΛΑΣ	0,5
ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2	ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2
ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8	ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8

Πίνακας 3 Σιτηρέσιο μετά τον απογαλακτισμό

Στην τελική ζωοτροφή το καλαμπόκι της ομάδας ελέγχου περιείχε 60% στερεά και 40% υγρασία, ενώ το καλαμπόκι της πολυφαινολικής ομάδας αποτελούνταν από 52,5% στερεά, 7,5% ΥΑΕ και 40% υγρασία.

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είχε μελετηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των ζωοτροφών με την μέθοδο του DPPH. Βρέθηκε ότι η ζωοτροφή που είναι εμπλουτισμένη με τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η εξέλιξη του σωματικού βάρους τόσο καθ' όλη την περίοδο της ανάπτυξής τους όσο και η ημερήσια αύξηση. Παρατηρήθηκε ότι τα πρόβατα στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, είχαν μεγαλύτερο σωματικό βάρος από την γέννηση μέχρι και την 42<sup>η</sup> ημέρα ηλικίας συγκριτικά με την ομάδα μάρτυρα. Αντίθετα, από την 42<sup>η</sup> ημέρα μέχρι και την 70<sup>η</sup> ημέρα το σωματικό βάρος των προβάτων μεταξύ των δυο ομάδων δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά.

### 3.2.Ομογενοποίηση ιστών

Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε Phosphate buffer (0.1M, pH=7.4) στο οποίο είχε προστεθεί ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets- Roche Diagnostics GmbH). Το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για 10sec (5x) για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε (10.000g, 15 min, 4°C). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και ακολούθησε προσδιορισμός της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την περαιτέρω βιοχημική τους ανάλυση.

### 3.3.Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των

πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm<sup>98</sup>.

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/ml ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 µg/ml. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 µL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20µL H<sub>2</sub>O και 1ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20µL προστίθενται κάθε φορά σε 1ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

### 3.4.Προσδιορισμός της δραστικότητας της Τρανσφεράσης της Γλουταθειόνης (GST)

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της GST στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα βασίστηκε στη μέθοδο των Habig et al. (1974).



Εικόνα 10 Η αντίδραση της GSH με το CDNB

Πιο αναλυτικά, αναμιγνύονται 920µL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (100mM, pH 7.4) με 50µL GSH (1mM) και 20µL CDNB και τα δείγματα επωάζονται για 5min στους 30°C. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 10µL του κυτοσολικού κυτταρολύματος και μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 340nm για 3min.

Τα δείγματα που δεν περιέχουν το κυτοσολικό κυτταρόλημα αποτελούν το τυφλό. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιείται με το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της GST με το υπόστρωμα (CDNB). Η δραστικότητα της GST υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του CDBN.

### 3.5. Προσδιορισμός της δραστικότητας της Υπεροξειδικής

#### Δισμουτάσης (SOD)

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της SOD στα δείγματα βασίστηκε στη μέθοδο του νιτροτετραζολιακού άλατος (NBT) σύμφωνα με τους Oberley & Spitz<sup>99</sup>.

Πιο αναλυτικά, 900μL SOD buffer (1 mM DETAPAC σε 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.8), 2.24mM NBT;  $10^{-4}$ M ξανθίνη) αναμιγνύονται με ~60mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3min στα 560 nm. Ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης καταγράφεται και χρησιμοποιείται ως ο ρυθμός του μάρτυρα (control rate). Στη συνέχεια, σε 800μL SOD buffer προστίθενται 100μL του ολικού κυτταρολύματος και ~60mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3min στα 560nm. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα.

### 3.6. Προσδιορισμός των επιπέδων της Συνθετάσης της Γλουταθειόνης με την μέθοδο Western Blot

Η τεχνική Western Blot (ή ανοσοαποτύπωση) είναι μια σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία. Χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και ανάλυση πρωτεϊνών βασιζόμενη στην ικανότητα τους να συνδέονται με ειδικά αντισώματα. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Towbin et al. (1979) και έκτοτε έχει γίνει μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους της έρευνας. Χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνική οι επιστήμονες μπορούν να προσδιορίσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες από ένα μίγμα πρωτεϊνών που εξάγεται από κύτταρα. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί τρεις συνιστώσες για να ολοκληρωθεί: 1)

διαχωρισμός βάσει μεγέθους, 2) μεταφορά σε στερεό υπόστρωμα και 3) σήμανση της πρωτεΐνης με το κατάλληλο πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα.

Στη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, το μίγμα της πρωτεΐνης εφαρμόζεται σε πηκτή ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE, native PAGE, ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων) για την ταξινόμηση των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος, το φορτίο ή άλλες διαφορές στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Οι διαχωρισμένες πρωτεϊνικές ζώνες στη συνέχεια μεταφέρονται σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης, PVDF). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται στύπωση. Οι πρωτεΐνες προσκολλώνται στη μεμβράνη με το ίδιο μοτίβο όπως είχαν διαχωριστεί. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες είναι προσβάσιμες στην πρόσδεση αντισωμάτων για ανίχνευση.

Η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

#### **Στάδιο 1: Προετοιμασία δείγματος**

Το πρώτο βήμα στην προετοιμασία δείγματος είναι η απομόνωση της πρωτεΐνης από το δείγμα. Συνήθως οι πρωτεΐνες προέρχονται από κύτταρα. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση του δείγματος. Έπειτα στο δείγμα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα (συνήθως Laemmli buffer) που περιέχει SDS, γλυκερόλη και β-μερκαπτοαιθανόλη (BME). Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρούνται και θερμαίνονται κοντά στο σημείο βρασμού, το οποίο μετουσιώνει την πρωτεΐνη και επιτρέπει την πρόσδεση του SDS στην πρωτεΐνη.

#### **Στάδιο 2: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση**

Το πρώτο βήμα είναι η τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια στην κορυφή του τζελ. Ένας δείκτης μοριακού βάρους συνήθως φορτώνεται σε ένα από τα πηγαδάκια, το οποίο καθορίζει το μοριακό βάρος των άλλων πρωτεϊνών στο πήκτωμα. Το πρωτεϊνικό μέγεθος μετράται σε kilodaltons (kDa). Η γλυκερόλη που περιέχεται στα δείγματα τα βοηθάει να βυθίζονται στα πηγαδάκια και το μπλε χρώμα επιτρέπει την οπτικοποίηση των δειγμάτων καθώς το τζελ τρέχει. Μόλις φορτωθεί ο δείκτης και τα δείγματα, εφαρμόζεται τάση ρεύματος (~150V) στην πηκτή ηλεκτροφόρησης. Καθώς ο πόλος στην κορυφή της πηκτής είναι αρνητικός και στην

άλλη άκρη είναι θετικός, επειδή οι πρωτεΐνες έχουν προσδεθεί με το αρνητικά φορτισμένο SDS μετακινούνται διαμέσου της πηκτής προς τον θετικό πόλο.

### **Στάδιο 3: Μεμβρανική μεταφορά**

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα τοποθετείται απέναντι σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή PVDF). Στη συνέχεια ρεύμα διέρχεται διαμέσου του πηκτώματος προς την μεμβράνη με σκοπό τη μεταφορά των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη.

### **Στάδιο 4: Ανοσοαποτύπωση**

Το πρώτο βήμα στην ανοσοαποτύπωση είναι το πλύσιμο και μπλοκάρισμα της μεμβράνης με μια μη-ειδική πρωτεΐνη. Η μη-ειδική πρωτεΐνη προσδένεται στην επιφάνεια της μεμβράνης όπου η πρωτεΐνη δεν είναι παρούσα και έτσι αποτρέπει την πρόσδεση του αντισώματος και την εμφάνιση μη-ειδικού σήματος. Στη συνέχεια, προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα στο διάλυμα που βρίσκεται η μεμβράνη, το οποίο αναγνωρίζει μια ειδική αμινοξική αλληλουχία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Έπειτα, πραγματοποιείται πλύση για να απομακρυνθεί το αδέσμευτο πρωτογενές αντίσωμα και προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει το πρωτογενές και συνήθως είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP. Τέλος, πραγματοποιείται πλύση για την απομάκρυνση του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος. Μη-ειδική δέσμευση των πρωτογενών και των δευτερογενών αντισωμάτων μπορεί να συμβεί αλλά οι πλύσεις ελαχιστοποιούν αυτό το πρόβλημα. Ο χρόνος επώασης του πρωτογενούς και του δευτερογενούς αντισώματος επηρεάζει άμεσα την ειδικότητα και την ισχύ της δέσμευσης.

### **Στάδιο 5: Ανίχνευση**

Η μέθοδος ανίχνευσης βασίζεται στο ένζυμο με το οποίο είναι συζευγμένο το δεύτερο αντίσωμα. Το πιο κοινό ένζυμο που χρησιμοποιείται στη μέθοδο Western Blot είναι το HRP και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι γνωστό ως υπόστρωμα χημειοφωταύγειας. Όταν το υπόστρωμα προστεθεί, το φως που εκπέμπεται μπορεί να ανιχνευθεί είτε με τη χρήση φιλμ είτε με τη χρήση ενός απεικονιστή εικόνων.

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της GCS χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης. Το κυτοσολικό κυτταρόλυμα που περιέχει 40μg πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της GCS. Στο πρωτεϊνικό κυτταρόλυμα προστίθεται 5× Loading buffer και ακολουθεί θέρμανση κοντά στο σημείο βρασμού για 3min. Στη συνέχεια τα προς ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά δείγματα “φορτώνονται” και διαχωρίζονται σε 5-8% SDS-PAGE πηκτή ακρυλαμίδης για 45-60min με τάση ρεύματος 150V. Η πηκτή ακρυλαμίδου διακρίνεται σε δύο επιμέρους μέρη: στο πρώτο τμήμα ή πηκτή πακεταρίσματος (stacking gel), όπου πακετάρονται τα δείγματα των πρωτεϊνών πριν διαχωριστούν. Η πηκτή πακεταρίσματος έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης (5%) (ddH<sub>2</sub>O, Tris 0.5M pH 6.8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Στο δεύτερο τμήμα ή πηκτή διαχωρισμού (separating gel) (ddH<sub>2</sub>O, Tris 1.5M pH 8.8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί μεταφορά και καθήλωση των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων μορίων από την πηκτή ακρυλαμίδου σε μεμβράνη (PVDF). Συγκεκριμένα, το πήκτωμα τοποθετείται μέσα σε μία κασετίνα που περιέχει τα εξής υλικά με την ακόλουθη σειρά: σφουγγαράκι, διηθητικό χαρτί Whatman, το πήκτωμα και από πάνω τη μεμβράνη PVDF, διηθητικό χαρτί Whatman και σφουγγαράκι. Κλείνουμε την κασετίνα και τοποθετείται σε μια ειδική θήκη μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφορείται για 2h με τάση ρεύματος τα 110V. Μετά την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα 1× TBST (50ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης στους 4°C overnight. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη επωάζεται για 1h με τα πρωτογενή αντισώματα (anti-GCS, αραιώση 1:600) σε διάλυμα 1× TBST (10ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 5 πλύσεις των 5min η καθεμία με το διάλυμα 1× TBST. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με τα δευτερογενή αντισώματα (anti-goat, αραιώση 1:3000) για 30min σε διάλυμα 1× TBST (10ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 15min της μεμβράνης με το διάλυμα 1×TBST. Έπειτα, η μεμβράνη εκτίθεται στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας για 1min και η ανίχνευση

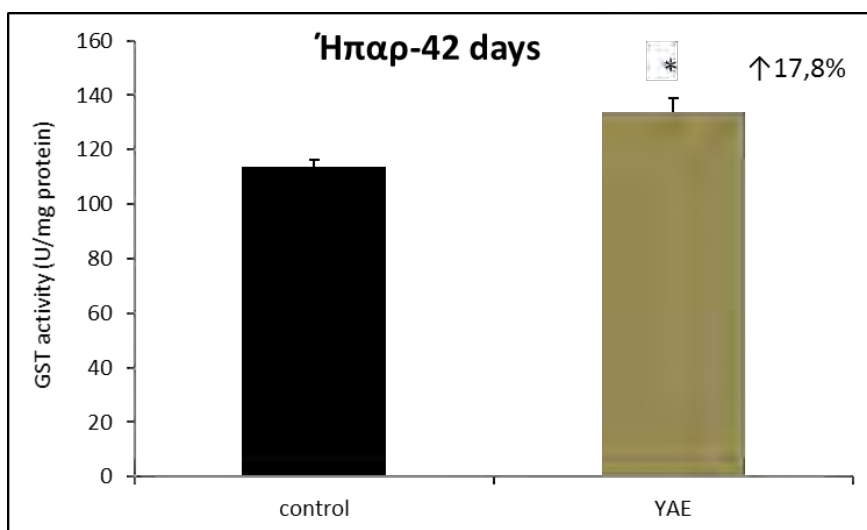
επιτυγχάνεται με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας ευαίσθητο στο μπλε φως (Kodak X-OMAT AR και Kodak Biomax XAR film). Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται από την ένταση και την ποιότητα του σήματος. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικά control. Το ποσό του ανοσοδραστικού προϊόντος σε κάθε γραμμή προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Alpha Innotech.



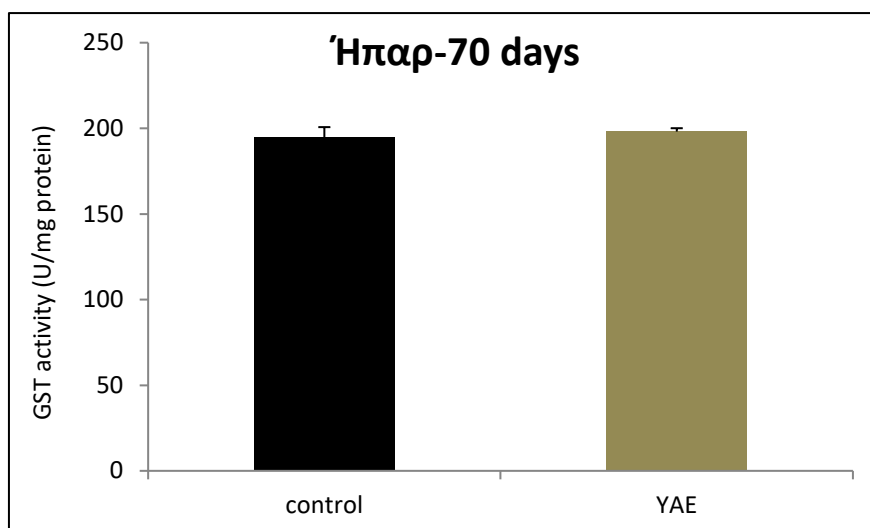
## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Αποτελέσματα προσδιορισμού της δραστικότητας της Τρανσφεράσης της Γλουταθειόνης (GST)

Η δραστικότητα της Τρανσφεράσης της γλουταθειόνης μελετήθηκε στο ήπαρ και στον σπλήνα τόσο στις 42 ημέρες όσο και στις 70 ημέρες. Στο ήπαρ, παρατηρήθηκε αύξηση της δραστικότητας της GST στις 42 ημέρες στην ομάδα προβάτων που είχαν τραφεί με ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα control κατά 17,8% ενώ στις 70 ημέρες δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη μεταβολή στην δραστικότητα του ενζύμου στην ομάδα προβάτων που είχαν τραφεί με ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα control.

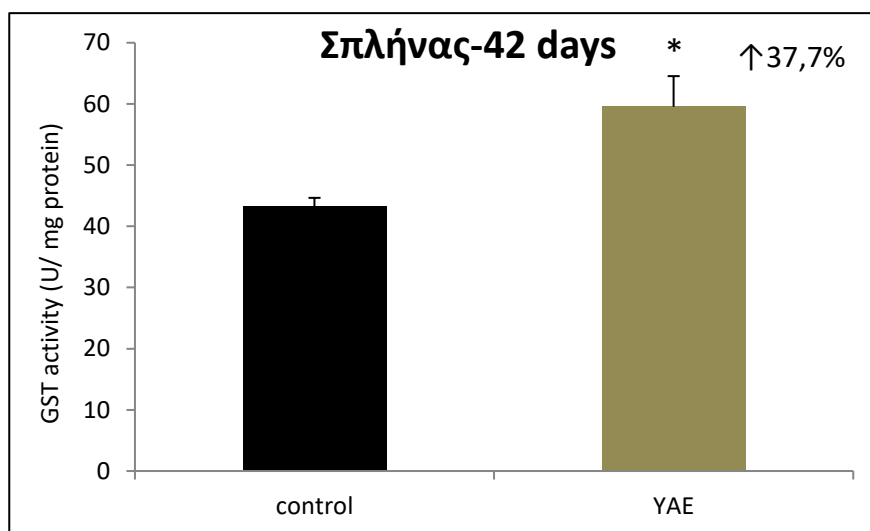


Διάγραμμα 2 Η επίδραση των ΥΑΕ στην ενζυμική δράση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, (GST) στο ήπαρ των προβάτων στις 42 ημέρες. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$ .

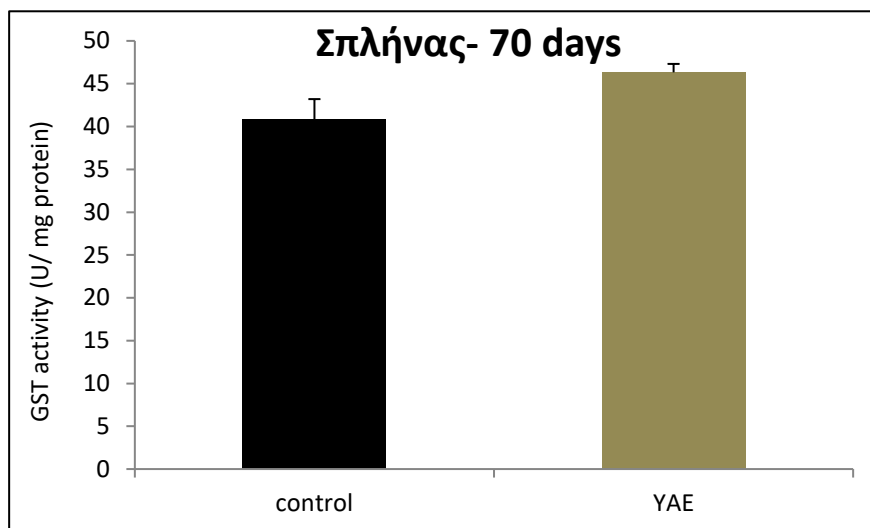


Διάγραμμα 3 Η επίδραση των YAE στην ενζυμική δράση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, (GST) στο ήπαρ των προβάτων στις 70 ημέρες. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

Στον σπλήνα, παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηρότητας της GST στις 42 ημέρες στην ομάδα προβάτων που είχαν τραφεί με YAE σε σχέση με την ομάδα control κατά 37,7% ενώ στις 70 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην δραστηρότητα του ενζύμου στην ομάδα προβάτων που είχαν τραφεί με YAE σε σχέση με την ομάδα control.



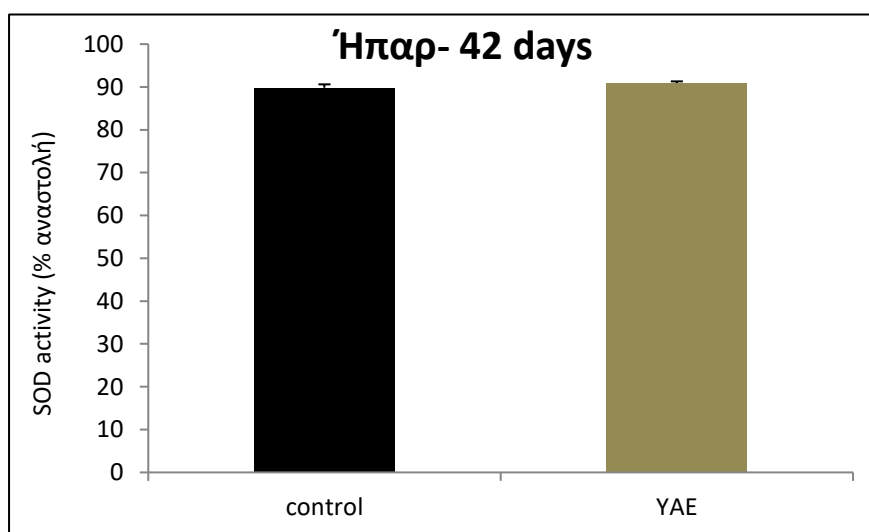
Διάγραμμα 4 Η επίδραση των YAE στην ενζυμική δράση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, (GST) στον σπλήνα των προβάτων στις 42 ημέρες. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM



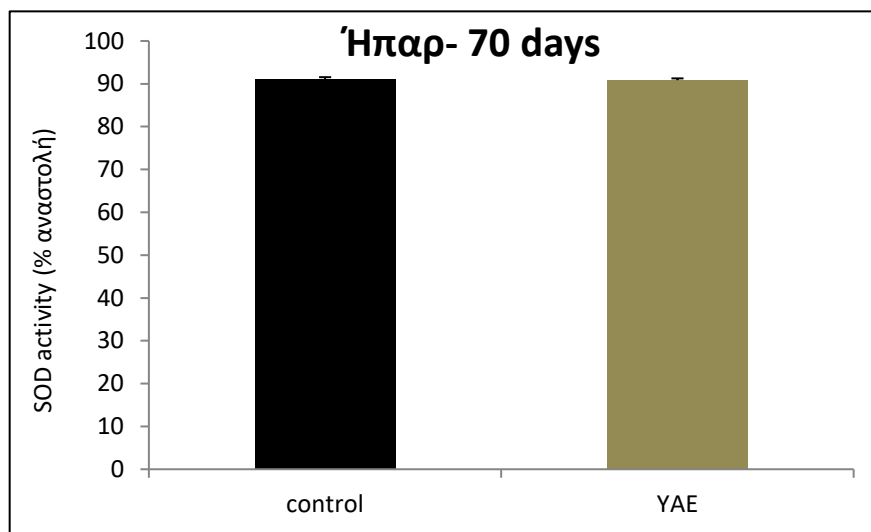
Διάγραμμα 5 Η επίδραση των YAE στην ενζυμική δράση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, (GST) στον σπλήνα των προβάτων στις 70 ημέρες. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM

#### 4.2. Αποτελέσματα προσδιορισμού της δραστηριότητας της Υπεροξειδικής Δισμουτάσης (SOD)

Η δραστηριότητα της SOD μελετήθηκε στο ήπαρ και στον σπλήνα τόσο στις 42 ημέρες όσο και στις 70 ημέρες. Στο ήπαρ τόσο στις 42 ημέρες όσο και στις 70 ημέρες δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα του ενζύμου. στην ομάδα προβάτων που είχαν τραφεί με YAE σε σχέση με την ομάδα control.

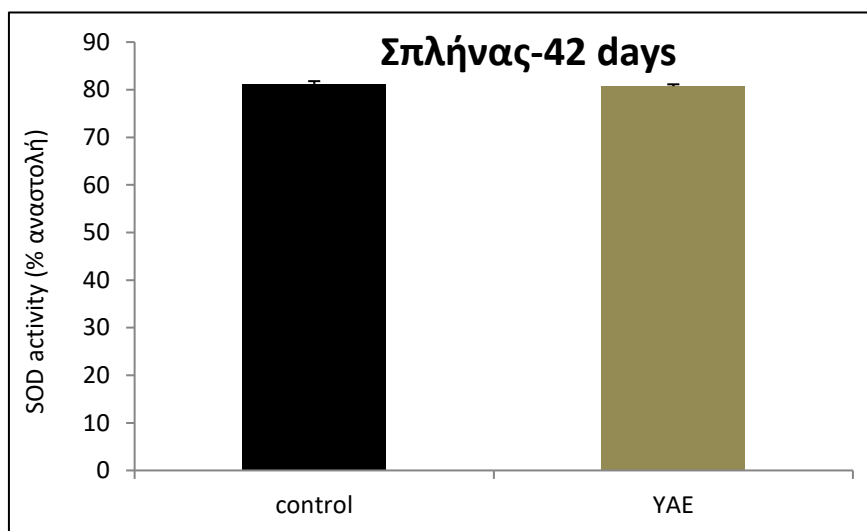


Διάγραμμα 6 Η επίδραση των YAE στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), στο ήπαρ των προβάτων στις 42 ημέρες. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

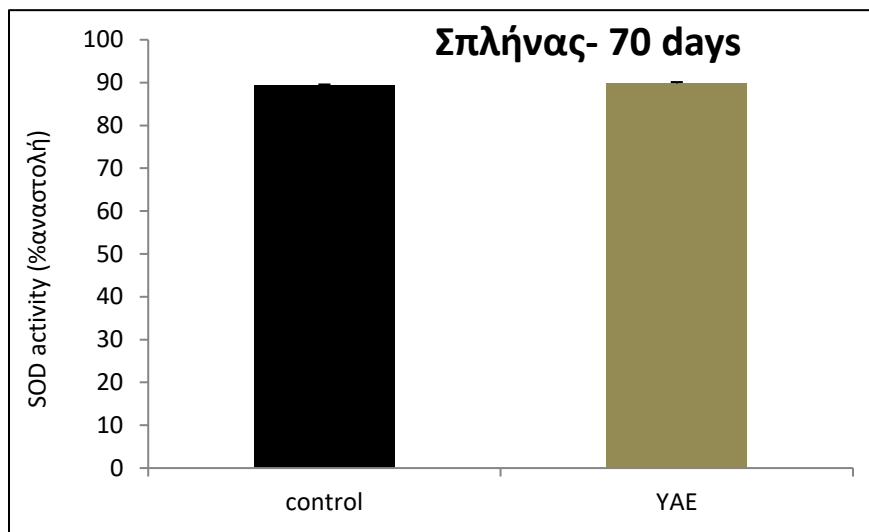


Διάγραμμα 7 Η επίδραση των YAE στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), στο ήπαρ των προβάτων στις 70 ημέρες. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

Στον σπλήνα, τόσο στις 42 ημέρες όσο και στις 70 ημέρες δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα του ενζύμου. στην ομάδα προβάτων που είχαν τραφεί με YAE σε σχέση με την ομάδα control.



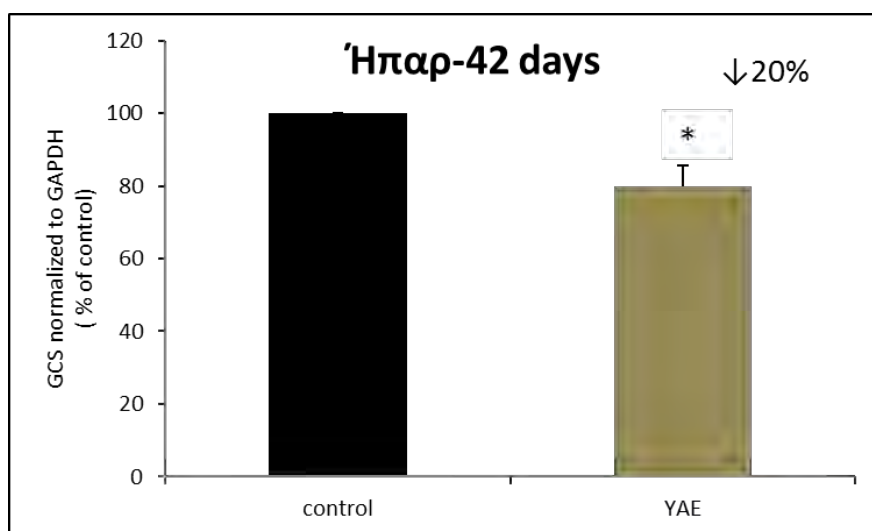
Διάγραμμα 8 Η επίδραση των YAE στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), στον σπλήνα των προβάτων στις 42 ημέρες. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



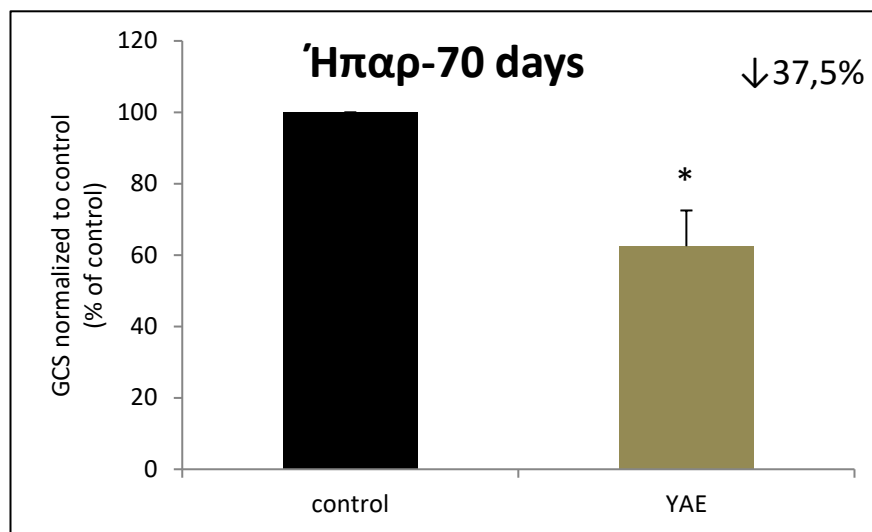
Διάγραμμα 9 Η επίδραση των YAE στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), στον σπλήνα των προβάτων στις 70 ημέρες. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

#### 4.3. Αποτελέσματα προσδιορισμού των επιπέδων της Συνθάσης της Γλουταθειόνης με την μέθοδο Western Blot

Η επίδραση των ΥΑΕ στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) μελετήθηκε στο ήπαρ και στον σπλήνα τόσο στις 42 ημέρες όσο και στις 70 ημέρες. Στο ήπαρ, παρατηρήθηκε μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της GCS τόσο στις 42 όσο και στις 70 ημέρες, στην ομάδα προβάτων που είχαν τραφεί με ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα control, κατά 20 % και 37,5 % αντίστοιχα.

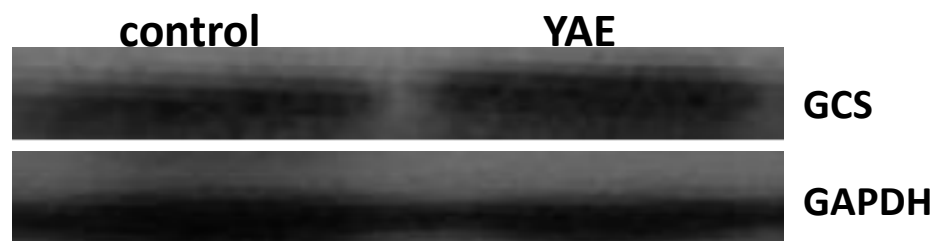
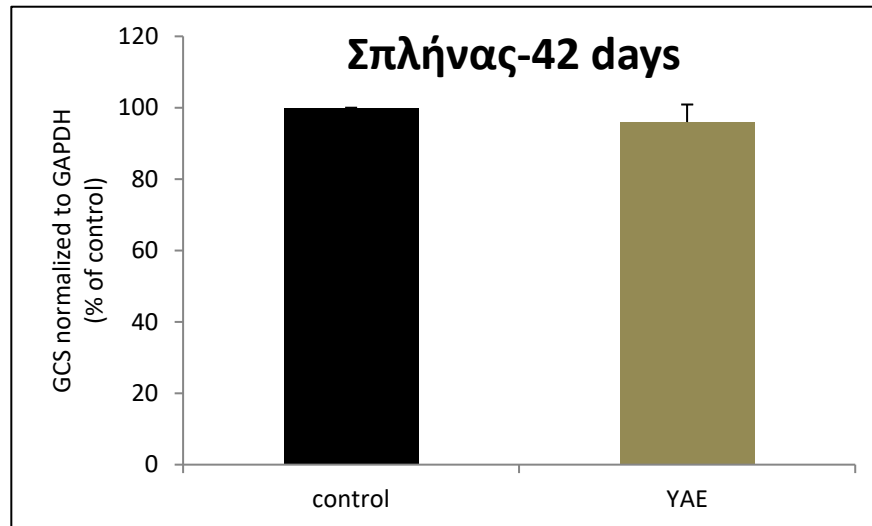


Διάγραμμα 10 Η επίδραση των ΥΑΕ στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στο ήπαρ των προβάτων στις 42 ημέρες. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM



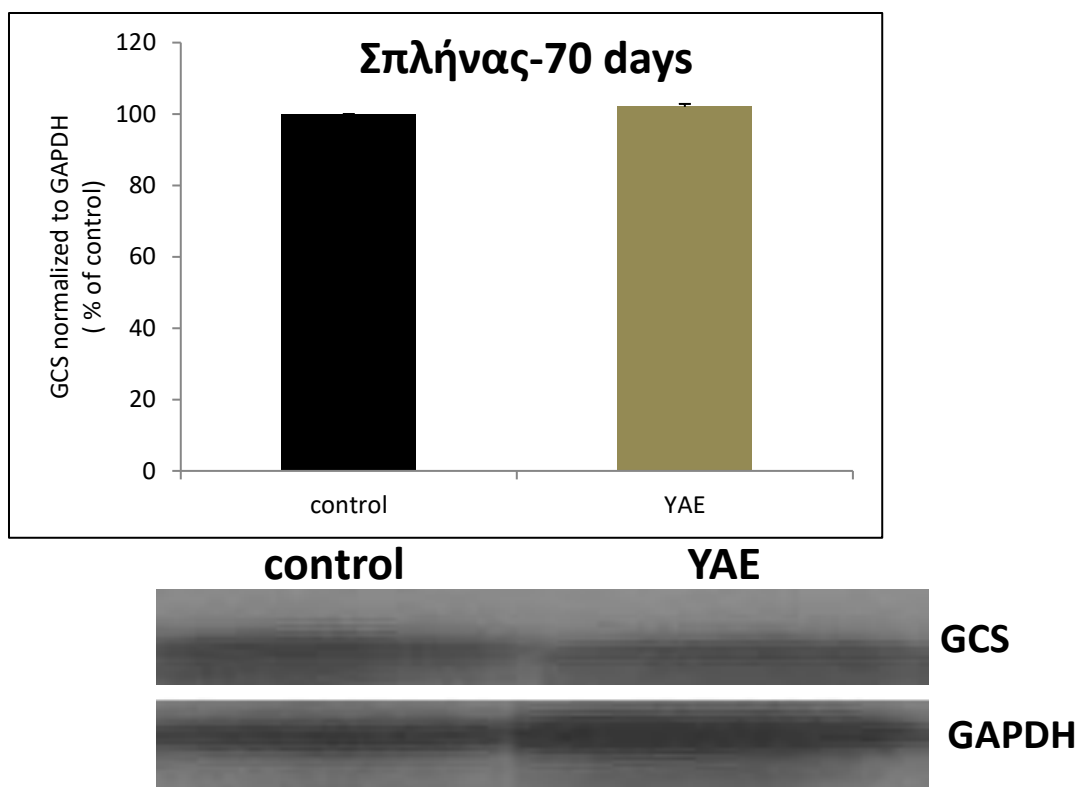
Διάγραμμα 11 Η επίδραση των ΥΑΕ στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στο ήπαρ των προβάτων στις 70 ημέρες. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM

Στον σπλήνα, τόσο στις 42 όσο και στις 70 ημέρες δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της GCS στην ομάδα προβάτων που είχαν τραφεί με ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα control.



Διάγραμμα 12 Η επίδραση των ΥΑΕ στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στον σπλήνα των προβάτων στις 42 ημέρες. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM





Διάγραμμα 13 Η επίδραση των YAE στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στον σπλήνα των προβάτων στις 70 ημέρες. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$

## 5. Συζήτηση

Η αγριελιά, ως δένδρο αυτοφυές, εντοπίζεται στην λεκάνη της Μεσογείου ήδη από την αρχαιότερη παλαιολιθική εποχή. Στον ελλαδικό χώρο, το παλαιότερο δείγμα απολιθωμένων φύλλων ελιάς βρέθηκαν στην καλντέρα της Σαντορίνης, σε λατομεία τέφρας νότια από τα Φηρά, που χρονολογήθηκαν γύρω στα 50.000- 60.000 π.Χ.. Η ιστορία της ελιάς και του λαδιού είναι συνυφασμένη με την ιστορία του μεσογειακού ανθρώπου. Μαζί με το σάρι και το κρασί, το λάδι αποτέλεσε μια από τις πιο βασικές διατροφικές πηγές των λαών της αρχαιότητας και διαδραμάτισε κύριο ρόλο στην διαμόρφωση των πολιτισμικών τους χαρακτηριστικών. Χρησιμοποιήθηκε σε λατρευτικά δρώμενα, στην αρωματοποιία, στην φαρμακευτική, στον αθλητισμό. Ήταν ένα εμπορικό προϊόν με υψηλή αξία και ήταν προνόμιο για τις πόλεις που το διέθεταν.

Από το 4000 π.Χ. ήταν γνωστή η χρήση του ελαιόλαδου για θεραπευτικούς σκοπούς. Ο Αριστοτέλης μελέτησε το ελαιόδεντρο και ανήγαγε την καλλιέργεια του σε επιστήμη. Ο Σόλων (639-559 π.Χ.) πρώτος νομοθέτησε την προστασία του. Ο Όμηρος το παρομοίασε με "χρυσό υγρό". Ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της Ιατρικής, το περιγράφει σαν το "τέλειο θεραπευτικό". Στις διασωθείσες εργασίες του αναφέρονται περισσότερες από 60 φαρμακευτικές και ιατρικές χρήσεις του ελαιόλαδου. Αυτές περιλαμβάνουν δερματολογικές ασθένειες, μυϊκούς πόνους, θεραπεία του έλκους και της χολέρας, φλεγμονές των ούλων, αϋπνία, ναυτία, πυρετό και στομαχικούς πόνους. Ο Διοσκουρίδης ονομάζει το ελαιόλαδο "προς την εν υγεία χρήσιν άριστον". Αναφέρει ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες κατά του έρπητος και της άφθας. Έχει θερμαντικές ιδιότητες, καταπολεμά την ουλίτιδα και διευκολύνει τη λειτουργία του παχέος εντέρου. Αναφέρει επίσης ότι το ελαιόλαδο από τις άγριες ελιές είναι στυπτικό, ευεργετικό για τις κεφαλαλγίες και την καταπολέμηση της πιτυρίδας. Η σύγχρονη έρευνα επιβεβαίωσε την διατροφική αξία του ελαιόλαδου. Είναι προϊόν γεμάτο αντιοξειδωτικά, μειώνει την LDL και αυξάνει την HDL. Έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, βοηθούν στην καταπολέμηση ασθενειών όπως η νόσος Alzheimer, ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, και διάφορες δερματικές ασθένειες<sup>4-22</sup>.

Η καλλιέργεια της ελιάς και η παραγωγή του ελαιόλαδου εξελίσσεται με την πάροδο των ετών. Η σύγχρονη παραγωγή του ελαιόλαδου περιλαμβάνει την χρήση

ελαιουργείων. Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα ρύπανσης στις ελαιοκομικές περιοχές αλλά και ένα σημαντικό πρόβλημα προς επίλυση για τη γεωργική βιομηχανία. Τα απόβλητα χαρακτηρίζονται από έντονα ιώδες- σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα, πολύ έντονη οσμή ελαιόλαδου, πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο, υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα και μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδραση της ενσιρωμένης ζωτροφής από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου σε 28 πρόβατα της Ελληνικής φυλής «Χιώτικα» τα οποία μέχρι τις 15 ημέρες από τη γέννησή τους, παρέμειναν με τις μητέρες τους για θηλασμό και στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, Α και Β, με 12 πρόβατα ανά ομάδα, σε ομαδικά κελιά. Είχαν ταυτόχρονη πρόσβαση σε πειραματικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) και μηδική (τριφύλλι), για κατανάλωση κατά βούληση. Η ομάδα Α αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, που λάμβανε σύνηθες σιτηρέσιο ανάπτυξης ενώ η ομάδα Β λάμβανε ζωτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα μείγματος αραβόσιτου και εκχύλισμα Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), σε αντικατάσταση του καρπού αραβόσιτου.

Οι ιστοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν το ήπαρ και ο σπλήνας των νεαρών προβάτων. Μελετήθηκαν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η συνθάση της γλουταθειόνης (GCS) και ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Τα ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II είναι υπεύθυνα για την αποτοξίνωση ξενοβιοτικών ουσιών και δραστικών μεταβολιτών που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε κύτταρα και ιστούς<sup>100</sup>.

Όσον αφορά τα ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II, , προσδιορίστηκε η ενζυμική δράση του ενζύμου μεταβολισμού της φάσης II, GST. Τα ισοένζυμα της GST παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση διάφορων κατηγοριών ηλεκτρονιόφιλων, ιδιαίτερα αυτών που προκύπτουν από την ενεργοποίηση καρκινογόνων, καθώς και των ROS και των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης<sup>97</sup>. Στο ήπαρ στις 42 ημέρες, τα ΥΑΕ αύξησαν την δράση της GST κατά 17,8% ενώ στις 70 ημέρες δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή. Στον σπλήνα στις 42 ημέρες η δράση της GST αυξήθηκε κατά 37,7% ενώ στις 70 ημέρες δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή.

Η SOD είναι ένα ένζυμο που εξουδετερώνει τις ενδοκυτταρικές ρίζες σουπεροξειδίου και παίζει σημαντικό ρόλο στο αμυντικό σύστημα απέναντι στο οξειδωτικό στρες<sup>57-61</sup>. Προσδιορίστηκε η ενζυμική δράση της SOD, η οποία είναι παρούσα στο κυτοσόλιο και τα μιτοχόνδρια, στο ολικό κυτταρόλυμα. Στο ήπαρ και στον σπλήνα τόσο στις 42 ημέρες όσο και στις 70 ημέρες δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή.

Τέλος, ένα άλλο αντιοξειδωτικό ένζυμο που μελετήθηκε σε επίπεδο ενζυμικής δράσης είναι η GCS. Η GCS είναι το πρώτο ένζυμο που συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της GSH. Στο ήπαρ στις 42 ημέρες τα YAE μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της GCS κατά 20% ενώ στις 70 ημέρες κατά 37,5%. Στον σπλήνα δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στις 42 ημέρες και στις 70 ημέρες.

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είχαν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα GSH στον σπλήνα μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας YAE ενώ στο ήπαρ δεν υπήρχε καμία μεταβολή στα επίπεδα της GSH μεταξύ των δυο ομάδων. Τα αποτελέσματα αυτά σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας μπορούν να μας δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της αντιοξειδωτικής κατάστασης των προβάτων. Στον σπλήνα, στις 42 ημέρες τα αυξημένα επίπεδα της GST σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα της GSH στον σπλήνα υποδηλώνουν αυξημένη ικανότητα αποτοξίνωσης του ζώου και καλύτερη προστασία του. Στα υπόλοιπα ένζυμα που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή ενώ στις 70 ημέρες η μόνη μεταβολή που παρατηρήθηκε στον σπλήνα είναι τα αυξημένα επίπεδα της GSH. Στο ήπαρ, δεν υπήρχε καμία μεταβολή στα επίπεδα της GSH, ενώ παρατηρήθηκε στις 42 ημέρες μια αύξηση των επιπέδων της GST ενώ τόσο στις 42 όσο και στις 70 ημέρες μια μείωση των επιπέδων της GCS. Όσο αναφορά την κατάσταση του ζώου στις 42 ημέρες η αύξηση των επιπέδων της GST και η μείωση των επιπέδων της GCS θα αναμέναμε να προκαλέσει και μείωση των επιπέδων της GSH, η οποία δεν παρατηρείται από τα αποτελέσματα του εργαστηρίου.

Συμπερασματικά, οι ζωοτροφές εμπλουτισμένες με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση που βελτιώνει το αντιοξειδωτικό προφίλ των προβάτων ενισχύοντας την άμυνα τους έναντι σε οξειδωτικούς παράγοντες. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι παράλληλα με

την βελτίωση του αντιοξειδωτικού προφίλ των προβάτων επιτυγχάνεται η αξιοποίηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου. Η επεξεργασία τους μπορεί να βοηθήσει αποτελεσματικά στη μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλείται απ' την ανεξέλεγκτη διάθεσή τους στο περιβάλλον.

## 6. Βιβλιογραφία

1. Gerasopoulos, K. *et al.* Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food Chem. Toxicol.* **82**, 42–49 (2015).
2. Gerasopoulos, K. *et al.* Assessment of Fatty Acid Allocation in Plasma and Tissues in Piglets, Using Feed Supplemented with Byproducts from Processed Olive Mill Wastewater. *In Vivo* **30**, 291–301
3. Gerasopoulos, K. *et al.* Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food Chem. Toxicol.* **86**, 319–327 (2015).
4. Bravo, L., Sources, D. & Significance, N. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317–333 (1998).
5. Khan, N. & Mukhtar, H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences* **81**, 519–533 (2007).
6. Hertog, M. G. *et al.* Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* **155**, 381–386 (1995).
7. Huber, B., Eberl, L., Feucht, W. & Polster, J. Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum-sensing. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **58**, 879–884 (2003).
8. John H Hart & Hillis W.E. Inhibition of wood-rotting fungi by stilbenes and other polyphenols in eucalyptus sideroxylon. *Phytopathology* (1974).
9. Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J. & Keast, R. S. J. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 218–36 (2009).
10. Gordon, T., Kannel, W. B., Castelli, W. P. & Dawber, T. R. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Arch. Intern. Med* **141**, 1128–1131 (1981).
11. Covas, M.-I. *et al.* The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors A Randomized Trial. *Ann. Intern. Med.* **145**, 333–341 (2006).
12. Witztum, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet (London, England)* **344**, 793–5 (1994).
13. Fito, M. *et al.* Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis* **181**, 149–158 (2005).

14. Vissers, M. N., Zock, P. L., Wiseman, S. a, Meyboom, S. & Katan, M. B. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **55**, 334–341 (2001).
15. Nicolaiew, N. *et al.* Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: Effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. *Ann. Nutr. Metab.* **42**, 251–260 (1998).
16. Ramírez-Tortosa, C. *et al.* Olive oil- and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *Br. J. Nutr.* **82**, 31–39 (1999).
17. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J* **17**, 1195–214 (2003).
18. Salvini, S. *et al.* Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br. J. Nutr.* **95**, 742–751 (2006).
19. Bogani, P., Galli, C., Villa, M. & Visioli, F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* **190**, 181–186 (2007).
20. Reinisch, N. *et al.* Association of high plasma antioxidant capacity with new lesion formation in carotid atherosclerosis: a prospective study. *Eur J Clin Invest* **28**, 787–792 (1998).
21. Visioli, F. *et al.* Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur. J. Nutr.* **44**, 121–7 (2005).
22. Weinbrenner, T. *et al.* Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J. Nutr.* **134**, 2314–21 (2004).
23. Evan, G. I. & Vousden, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**, 342–348 (2001).
24. Sukhsatej Batra. Phenols in Extra Virgin Olive Oil Inhibit Colon Cancer Cell Growth. *oliveoiltimes* (2014).
25. Medina, E., De Castro, A., Romero, C. & Brenes, M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4954–4961 (2006).
26. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. *Free Radicals in Biology and Medicine - Paperback - Barry Halliwell, John M. C. Gutteridge - Oxford University Press.* (1999).

27. Sen, C. K. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* **33**, 368–70 (2001).
28. Prior, R. L. & Cao, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 1173–81 (1999).
29. Halliwell, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *Encycl. Life Sci.* 1–7 (2001). doi:10.1038/npg.els.0003913
30. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. (Clarendon Press, 1989).
31. Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**, 872–879 (2002).
32. Di Meo, S. & Venditti, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol. Signals Recept.* **10**, 125–40
33. Sjödin, B., Hellsten Westing, Y. & Apple, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* **10**, 236–54 (1990).
34. Lenaz, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 53–67 (1998).
35. Muller, F. L., Liu, Y. & Van Remmen, H. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *J. Biol. Chem.* **279**, 49064–49073 (2004).
36. Lenaz, G. *et al.* Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 397–404 (2000).
37. Meydani, M. *et al.* Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **669**, 363–4 (1992).
38. Petrone, W. F., English, D. K., Wong, K. & McCord, J. M. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 1159–63 (1980).
39. Downey, J. M. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 487–504 (1990).
40. Kuppusamy, P. & Zweier, J. L. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* **264**, 9880–4 (1989).
41. Yu, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**, 139–162 (1994).
42. Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527–605 (1979).



43. Koren, H. S. Associations between criteria air pollutants and asthma. in *Environmental Health Perspectives* **103**, 235–242 (1995).
44. Victorin, K. Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **317**, 43–55 (1994).
45. Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N. & Kondo, M. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 30S–34S (1998).
46. Ray, R. S. *et al.* Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem. Toxicol.* **24**, 191–200 (2001).
47. Elsayed, N. M., Omaye, S. T., Klain, G. J. & Korte, D. W. Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology* **72**, 153–165 (1992).
48. Jones, D. P. *et al.* Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 625–635 (2000).
49. Obata, T., Yamanaka, Y., Kinemuchi, H. & Orelan, L. Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res.* **906**, 170–5 (2001).
50. Wormser, U., Sintov, A., Brodsky, B. & Nyska, A. Topical iodine preparation as therapy against sulfur mustard-induced skin lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **169**, 33–9 (2000).
51. Ames, B. N. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Prog. Clin. Biol. Res.* **206**, 3–32 (1986).
52. Kanner, J. & Lapidot, T. The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1388–1395 (2001).
53. Lijinsky, W. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **443**, 129–138 (1999).
54. Sen, C. K. & Packer, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* **10**, 709–20 (1996).
55. Rimbach, G. *et al.* Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch. Anim. Nutr. Fur Tierernahrung* **52**, 203–222 (1999).
56. Reid, M. B. Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle: Invited Review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* **90**, 724–731 (2001).
57. Linnane, A. W. *et al.* Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann.*

- N. Y. Acad. Sci.* **959**, 396-411-465 (2002).
58. Finaud, J., Lac, G. & Filaire, E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med.* **36**, 327–58 (2006).
  59. Jenkins, R. R. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sport. Med* **5**, 156–70. (1988).
  60. Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T. & Wilson, M. T. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **30**, 280–285 (2002).
  61. Golden, T. R., Hinerfeld, D. A. & Melov, S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* **1**, 117–123 (2002).
  62. Dekkers, J. C., van Doornen, L. J. & Kemper, H. C. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sport. Med* **21**, 213–238 (1996).
  63. Powers, S. K. & Lennon, S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.* **58**, 1025–1033 (1999).
  64. Culotta, V. C., Yang, M. & O'Halloran, T. V. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1763**, 747–758 (2006).
  65. Suzuki, K. *et al.* in *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise* 243–295 (2000). doi:10.1016/B978-044482650-3/50011-0
  66. Antunes, F., Han, D. & Cadenas, E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1260–7 (2002).
  67. Brigelius-Flohé, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol. Chem.* **387**, 1329–35
  68. Drevet, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Mol. Cell. Endocrinol.* **250**, 70–79 (2006).
  69. Björnstedt, M., Kumar, S., Björkhem, L., Spyrou, G. & Holmgren, A. Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed. Environ. Sci.* **10**, 271–9 (1997).
  70. Callahan, L. A., Nethery, D., Stofan, D., DiMarco, A. & Supinski, G. Free radical-induced contractile protein dysfunction in endotoxin-induced sepsis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 210–217 (2001).
  71. Callahan, L. A., Stofan, D. A., Szweda, L. I., Nethery, D. E. & Supinski, G. S. Free radicals alter maximal diaphragmatic mitochondrial oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 129–138 (2001).

72. Meister, A. & Anderson, M. E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711–60 (1983).
73. Niki, E. *et al.* Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.* **260**, 2191–2196 (1985).
74. Townsend, D. M., Tew, K. D. & Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **57**, 145–155 (2003).
75. Lu, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell. Regul.* **36**, 95–116 (2000).
76. Aw, T. Y. Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol. Sci.* **18**, 201–204 (2003).
77. Ozhogina, O. A. & Kasaikina, O. T. Beta-carotene as an interceptor of free radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 575–81 (1995).
78. Livrea, M. A. *et al.* Contribution of Vitamin-a to the Oxidation Resistance of Human Low-Density Lipoproteins. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 401–409 (1995).
79. Bigard, A. X. Lesions musculaires induites par l'exercice et surentrainement. *Sci. Sports* **4**, 204–215 (2001).
80. Palmer, F. M. *et al.* Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur. J. Appl. Physiol.* **89**, 100–107 (2003).
81. Fuchs, J. *et al.* HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 330–6 (2003).
82. Evans, W. J. Vitamin E, vitamin C, and exercise. in *American Journal of Clinical Nutrition* **72**, (2000).
83. Coombes, J. S. *et al.* Effects of vitamin E and alpha-lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *J Appl Physiol* **90**, 1424–1430 (2001).
84. Vasankari, T. J., Kujala, U. M., Vasankari, T. M., Vuorimaa, T. & Ahotupa, M. Effects of acute prolonged exercise on-serum and LDL oxidation and antioxidant defences. *Free Radic Biol Med* **22**, 509–513 (1997).
85. Mastaloudis, A., Leonard, S. W. & Traber, M. G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 911–922 (2001).
86. Svensson, M. B. *et al.* Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiol. Scand.* **176**, 43–56 (2002).

87. Grootveld, M. & Halliwell, B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of free-radical reactions in vivo? *Biochem. J.* **243**, 803–8 (1987).
88. Hellsten, Y., Tullson, P. C., Richter, E. A. & Bangsbo, J. Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. *Free Radic Biol Med* **22**, 169–174 (1997).
89. Hellsten, Y., Sjödin, B., Richter, E. a & Bangsbo, J. Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am. J. Physiol.* **274**, E600–E606 (1998).
90. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. & Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 6858–62 (1981).
91. Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Barclay, L. R. C. & Locke, S. J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *BBA - Gen. Subj.* **924**, 408–419 (1987).
92. Kean, R. B., Spitsin, S. V, Mikheeva, T., Scott, G. S. & Hooper, D. C. The peroxynitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. *J. Immunol.* **165**, 6511–8 (2000).
93. Davies, K. J., Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S. F. & Hochstein, P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J.* **235**, 747–54 (1986).
94. Sevanian, A., Davies, K. J. A. & Hochstein, P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, (1991).
95. N., M. *et al.* Dietary coenzyme Q10 supplement renders swine hearts resistant to ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **278**, H1084–H1090 (2000).
96. Witt, E. H., Reznick, a Z., Viguie, C. a, Starke-Reed, P. & Packer, L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J. Nutr.* **122**, 766–773 (1992).
97. Crane, F. L. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* **20**, 591–598 (2001).
98. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).

99. Oberley, L. W. & Spitz, D. R. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* **105**, 457–64 (1984).
100. Yang, Y. M., Noh, K., Han, C. Y. & Kim, S. G. Transactivation of genes encoding for phase II enzymes and phase III transporters by phytochemical antioxidants. *Molecules* **15**, 6332–6348 (2010).